

Tesis de Posgrado

Estudio sobre rutas biosintéticas alternativas del anillo butenólido de cardenólidos en *Digitalis purpurea*

Maier, Marta Silvia

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Maier, Marta Silvia. (1985). Estudio sobre rutas biosintéticas alternativas del anillo butenólido de cardenólidos en *Digitalis purpurea*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1889_Maier.pdf

Cita tipo Chicago:

Maier, Marta Silvia. "Estudio sobre rutas biosintéticas alternativas del anillo butenólido de cardenólidos en *Digitalis purpurea*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1889_Maier.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIO SOBRE RUTAS BIOSINTETICAS ALTERNATIVAS DEL
ANILLO BUTENOLIDO DE CARDENOLIDOS EN
DIGITALIS PURPUREA

Autora

Lic. Marta Silvia Maier

Director de Tesis

Dr. Eduardo G. Gros

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

1985
Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Químicas

1985

*Tesis 1889
ej 2*

A Horacio, por todo lo que compartimos.

A mis padres, por su amor y ejemplo.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Eduardo G. Gros, quien sugiriera el tema de esta tesis y dirigiera su desarrollo, por su dedicación y rigurosidad, que fueron las enseñanzas más valiosas de él recibidas y que sirvieron de ejemplo a mi formación científica.

Agradezco a la Dra. Alicia M. Seldes,
quien supervisara esta tesis, por su
interés y preocupación, tanto en el
desarrollo de la misma como en mi ca-
pacitación profesional.

También deseo agradecer:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado una Beca de Iniciación y una de Perfeccionamiento para la realización de este trabajo de investigación.

A UMYMFOR (CONICET-FCEN), por la realización de las determinaciones instrumentales:

Dr. G. Burton y Sr. C.G. Arabehty, por los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C .

Sr. J.A. Aznárez, por los espectros de masa.

Lic. M.M. Rivero y M.M. de Moglia por las cromatografías gas-líquido.

Srta. A.B. Arenaza por los espectros infrarrojo.

Lic. J.B. Rodríguez por las cromatografías líquidas de alta resolución.

Al Dr. C.P. Lantos (Depto. Química Biológica, FCEN, UBA), por facilitarnos el uso del contador de centelleo líquido Tracor Analytic Mark III.

Al Dr. I. Mizrahi (INTA, Castelar), por las semillas de Digitalis purpurea suministradas.

Al Dr. J. Hunziker por permitirnos el uso de un sector del vivero.

Al Dr. G. Burton y al Lic. A.A. Ghini por el uso de la cámara de acrílico.

Al Dr. A. Mitta y al Sr. C. Arciprete, por proporcionarnos el bromoacetato de etilo-(1- ^{14}C).

A la Lic. M.S. Romero por la fotografía de la planta Digitalis purpurea y, sobre todo, por su amistad y compañerismo en todo momento.

A mis amigos del Depto. de Química Orgánica con quienes compartí mis inquietudes, alegrías y tristezas y, además, por contribuir con su afecto y presencia a la realización de este trabajo y a mi formación como ser humano.

A todos mis compañeros y personal del Depto. de Química Orgánica por su cordialidad.

INDICE

pág.

Capítulo 1

Introducción

Características de la planta <u>Digitalis purpurea</u>	13
Antecedentes históricos de la acción farmacológica de los glicósidos cardenólidos.....	16
Generalidades sobre los glicósidos cardenólidos.....	18

Capítulo 2

Propósitos de esta investigación

Antecedentes.....	24
Objetivos específicos.....	36

Capítulo 3

Descripción de la labor realizada

A. Síntesis de ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos y 23-norcol-20(22)(E)-énicos.....	41
1. a.- Síntesis del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23- norcol-5-énico.....	44
1. b.- Síntesis del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23- norcol-5-énico-24- ¹⁴ C.....	47
2. a.- Síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5, 20(22)(E)-diénico.....	48
2. b.- Síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5, 20(22)(E)-diénico-24- ¹⁴ C.....	51
3. a.- Síntesis del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-	

23-norcol-4-énico.....	52
3. b.- Síntesis del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi- 23-norcol-4-énico-24- ¹⁴ C.....	60
4. a.- Síntesis del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20 (22)(E)-diénico.....	61
4. b.- Síntesis del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20 (22)(E)-diénico-24- ¹⁴ C.....	65
5. a.- Síntesis del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23- nor-5 β -colánico.....	67
5. b.- Síntesis del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23- nor-5 β -colánico-24- ¹⁴ C.....	69
6. a.- Síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col- 20(22)(E)-énico.....	70
6. b.- Síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col- 20(22)(E)-énico-24- ¹⁴ C.....	72
7. a.- Síntesis del ácido 3 β ,14 β ,20(R,S)-trihidro- xi-23-nor-5 β -colánico.....	73
7. b.- Síntesis del ácido 3 β ,14 β ,20(R,S)-trihidro- xi-23-nor-5 β -colánico-24- ¹⁴ C.....	81
B. Ensayos tendientes a obtener la sal de sodio del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico.....	83
C. Síntesis de 3 β ,20-dihidroxi-20-metil-pregn-5-eno y 3 β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno.....	85
D. Ensayos preliminares para el aislamiento de glicó- sidos cardenólidos.....	87
1. Extracción de glicósidos cardenólidos de plantas <u>Digitalis purpurea</u>	87

2. Purificación del extracto de glicósidos	
cardenólidos.....	90
3. Análisis de las fracciones de glicósidos	
cardenólidos aisladas por CCD.....	92
E. Método de inoculación de compuestos radiactivos.....	96
1. Ensayos con plantas enteras.....	96
2. Ensayos con hojas cortadas.....	98
F. Degradación de digitoxina.....	101

Capítulo 4

Espectrometría de RMN-¹³C

Introducción.....	104
1. Esteres etílicos de ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-nor-	
colanoicos.....	112
2. Ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos.....	120
3. Esteres etílicos de ácidos 23-norcol-20(22)(E)-	
énicos.....	123
4. Ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos.....	124
5. Compuestos 14 β -hidroxilados.....	125

Capítulo 5

Presentación y discusión de los resultados

1. Inoculación de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norco-	
lanoicos-24- ¹⁴ C y 23-norcol-20(22)(E)-énicos-24- ¹⁴ C	
en plantas <u>Digitalis purpurea</u>	137
2. Discusión de los resultados obtenidos.....	147
3. Degradación de digitoxina- ¹⁴ C.....	157

Capítulo 6

Parte Experimental

Generalidades.....	160
Material vegetal.....	163
Condiciones generales de germinación y desarrollo.....	163
A. Síntesis de ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos y 23-norcol-20(22)(E)-énicos.....	164
B. Síntesis de 3 β ,20-dihidroxi-20-metil-pregn-5-eno y de 3 β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno.....	219
C. Método de inoculación de los ácidos 20(R,S)-hidroxi- 23-norcolanoicos-24- ¹⁴ C y 23-norcol-20(22)(E)-éni- cos-24- ¹⁴ C en plantas <u>Digitalis purpurea</u>	221
D. Aislamiento de los glicósidos cardenólidos.....	222
E. Purificación del extracto de glicósidos cardenólidos	223
F. Degradación de digitoxina- ¹⁴ C.....	224
Resumen.....	228
Bibliografía.....	231

LAS LABORES QUE SE DESCRIBEN EN EL PRESENTE TRABAJO ESTUVIERON ENCAMINADAS AL LOGRO DE UN MAYOR CONOCIMIENTO SOBRE EL PROCESO BIOLOGICO DE FORMACION, EN PLANTAS Digitalis purpurea, DE LOS GLICOSIDOS CARDENOLIDOS QUE CONTIENEN.

EN PARTICULAR, SE BUSCO ESTABLECER LA SECUENCIA NATURAL DE UNO DE LOS ULTIMOS PASOS DEL CAMINO BIOSINTETICO: EL CONDUCTENTE A LA CONSTITUCION DEL ANILLO LACTONICO DE LOS REFERIDOS GLICOSIDOS.

INTRODUCCION

Características de la planta Digitalis purpurea

La Digitalis purpurea es una planta vigorosa, bianual, de uno a dos metros de altura, perteneciente a la familia de las Scrophulariáceas. Posee grandes hojas ovales, tallo simple y flores tubulares agrupadas formando espigas terminales. Sus bonitas flores de color púrpura tienen cierta semejanza con los dedales que se utilizan para coser, lo que le ha valido el nombre común de "Dedalera".

La planta tiene una gran aplicación en jardinería y por su contenido en glicósidos cardiotónicos se la ha utilizado en medicina desde el siglo XIII.

Es originaria de Europa meridional y Asia occidental. En Argentina crece espontáneamente en los valles cordilleranos de la Patagonia, desde el Lago Nahuel Huapi hasta el Lago Argentino, y su origen se remonta a los cultivos hechos en Chile por los jesuitas a fines del siglo XVII.

Se siembra de semilla en almácigos durante la primavera, hasta mediados del verano, para transplantarla en otoño. El clima y la naturaleza del terreno son de fundamental importancia, siendo preferible el sílico-arcilloso-ácido.

Las semillas de Digitalis purpurea contienen cardenólidos cuya concentración decrece lentamente durante el período de germinación (30 días aproximadamente) de 0,2 mg a 0,042 mg/g de planta fresca ¹. En plantas de un año de desarrollo las mayores concentraciones se encuentran en las hojas más jóvenes. En el segundo año, los cardenólidos se distribuyen en los órganos jó-

venes de la planta, es decir, flores, frutos y hojas, encontrándose pequeñas cantidades también en las raíces ². Sin embargo, la cantidad total y la distribución relativa de los mismos depende de factores ecológicos, grado de desarrollo de la planta, tiempo de cosecha, etc. Movitt ³ informa valores que oscilan entre 5 mg y 500 mg de digitoxina/kg de hojas secas, dependiendo del lugar de origen de la planta.

Con respecto a la función que cumplen los glicósidos cardenólidos en la planta, aún no se ha llegado a una conclusión concreta. Se supone que pueden tener tanto funciones regulatorias como ecológicas. Pueden estar involucrados en el proceso de vida de las plantas o ayudarlas a sobrevivir en presencia de hongos, insectos y animales superiores ⁴. Sin embargo, se ha descubierto que muchos insectos pueden ingerir glicósidos cardiotónicos, por lo que se cree que también podrían cumplir una función de protección en insectos, contra sus depredadores ⁵.



Ejemplar de Digitalis purpurea.

Antecedentes históricos de la acción farmacológica de los glicósidos cardenólidos

La primera mención sobre el uso en medicina de la planta Digitalis purpurea por cirujanos galeses en el siglo XIII, antecede en aproximadamente trescientos años, la descripción botánica de la planta. Mientras algunos la consideraron como un veneno, otros reconocieron sus propiedades medicinales. Sin embargo, durante muchos años se desconoció la acción terapéutica específica de la droga y se usó como una panacea para una variedad de dolencias como epilepsia, úlcera y heridas. Los efectos tóxicos de la misma fueron reconocidos mucho antes que sus propiedades terapéuticas. En el siglo XVII se la utilizó como expectorante, emético y purga.

El comienzo de la terapia específica con Digitalis purpurea se inicia con Withering, quien en 1785 la aplicó al tratamiento de la gota. Observó, además, su potente acción diurética pero no reparó en su acción cardíaca.

El modo de acción de la droga permaneció oscuro durante muchos años y su uso se basó únicamente en factores empíricos. El redescubrimiento de su aplicación en medicina se debe a Sir James Mackenzie, quien destacó que era un principio terapéutico indispensable.

En sus comienzos, su uso estuvo aplicado a un solo tipo de desorden cardíaco: las arritmias. A principios de este siglo se comenzó a usar en el tratamiento de descompensación cardíaca, con ritmo regular, ya que se comprobó que la droga tiene la ca-

pacidad de aumentar la eficiencia mecánica del corazón, reducir la dilatación cardíaca y disminuir la presión venosa, aliviando los síntomas de la descompensación.

Como el contenido de principios activos en Digitalis purpurea varía con el lugar de origen de la planta y su edad y como la potencia de los mismos es función del grado de deterioro de la planta y del modo de preparación de la droga, fue necesario lograr una estandarización apropiada del producto. Para ello se utilizó la técnica del ensayo biológico empleando sapos y gatos.

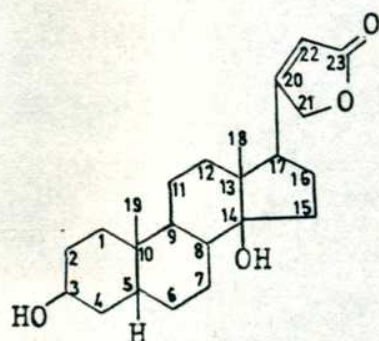
Las preparaciones de la droga a partir de hojas enteras de la planta se presentan en diferentes formas, tales como píldoras, tabletas, cápsulas y supositorios, siendo la administración oral la más comunmente empleada.

En cuanto al aislamiento e identificación de los glicósidos cardiotónicos, los primeros trabajos se deben a Smith ⁶ y a Stoll ⁷. Actualmente los avances en las técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), han provisto una herramienta más eficiente para su separación y caracterización, facilitando su aislamiento de la planta, donde generalmente se encuentran en muy pequeñas cantidades.

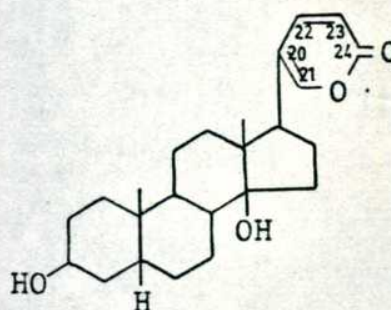
Generalidades sobre los glicósidos cardenólidos

Reciben el nombre de principios cardiotónicos o cardioactivos aquellos productos que, por administración a humanos y animales, tienen la propiedad de ejercer una acción específica y poderosa sobre el músculo cardíaco.

Los productos cardiotónicos con estructura esteroideal pertenecen a dos grupos: cardenólidos y bufadienólidos, caracterizados fundamentalmente por la presencia de un anillo lactónico unido a C-17 (figura 1). Según se trate de cardenólidos o bufadienólidos dicho anillo lactónico presenta diferente estructura.



Digitoxigenina (1)
(cardenólido)



Bufalina
(bufadienólido)

Figura 1: Ejemplo de los distintos tipos de principios cardiotónicos.

Los cardenólidos son esteroides de veintitres átomos de carbono, con un anillo lactónico de cinco miembros α, β no saturado

(grupo butenólido), mientras que los bufadienólidos poseen veinticuatro átomos de carbono y un anillo lactónico de seis miembros con dos dobles enlaces (α -pirona). Ambos tipos de compuestos poseen el sistema de cuatro ciclos del tipo de un esteroide, pero la unión entre los anillos C y D es cis, con una función oxigenada en C-14 orientada β , pudiendo tratarse de un hidroxilo 14β o un anillo epóxido $14\beta, 15\beta$. La configuración en el C-5 es β en los bufadienólidos (anillos A y B cis), mientras que en los cardenólidos puede ser α o β o poseer un doble enlace en la posición 5(6). Los bufadienólidos vegetales suelen presentar un doble enlace en la posición 4(5) ⁸.

Ambos tipos de compuestos presentan numerosas variaciones estructurales consistentes en una diferente configuración en el C-3 y la presencia de funciones oxigenadas y de dobles enlaces en distintas posiciones del sistema polinuclear.

Tanto los cardenólidos como los bufadienólidos, cuando provienen de vegetales, se encuentran como glicósidos, pudiendo presentarse varios tipos de monosacáridos y oligosacáridos ⁹.

Un hecho destacable es que los bufadienólidos tienen origen no sólo en vegetales sino también en animales, dado que se los ha encontrado en el veneno de los sapos, aunque en este último caso no se presentan como glicósidos sino en forma libre o conjugados con la suberilarginina formando las llamadas bufotoxinas ¹⁰.

Los glicósidos cardenólidos comprenden uno de los grupos de sustancias naturales más interesantes, por su eficacia en el tratamiento de enfermedades cardíacas. Pequeñas dosis de estos

compuestos pueden ejercer una acción beneficiosa en un organismo enfermo, ya que estimulan el funcionamiento del corazón provocando un incremento de la contractibilidad del músculo cardíaco y una disminución de la frecuencia lográndose entonces, una mayor eficiencia cardíaca.

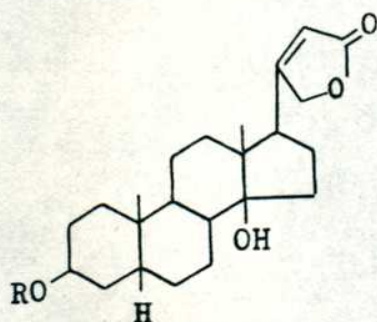
En su estado natural, los glicósidos cardenólidos se encuentran asociados con saponinas, que también son sustancias glicósídicas y afectan la solubilidad de los principios cardiotónicos, pero son inertes desde el punto de vista terapéutico.

Se ha establecido que los glicósidos deben su actividad farmacológica a las agliconas. Los hidratos de carbono son inactivos en forma pura, pero cuando se combinan con las agliconas aumentan la potencia y la toxicidad del principio activo. Además, se considera que afectan ciertas propiedades físicas, como su solubilidad en agua y su difusión a través de membranas semipermeables. También la persistencia de la acción cardíaca de estos principios está determinada por los hidratos de carbono, ya que actúan como grupos protectores del hidroxilo de C-3 evitando su epimerización a productos 3α -hidroxi, que han demostrado ser inactivos.

Los hidratos de carbono obtenidos a partir de los glicósidos cardenólidos comprenden monosacáridos normales, 2-desoxi-hexosas y un grupo especial de hidratos de carbono carbocíclicos.

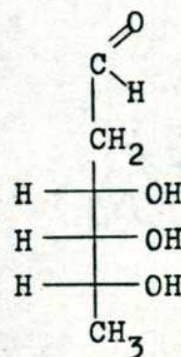
Los glicósidos cardenólidos se encuentran, principalmente, en plantas de los géneros Digitalis y Strophantus. Las especies Digitalis lanata y Digitalis purpurea son, casi exclusivamente,

las utilizadas para la preparación de específicos medicinales y para la obtención de glicósidos puros. El principal glicósido de estas especies es la digitoxina (2), la que está estructuralmente formada por la digitoxigenina (1) (aglicona de tipo cardenólido) y el hidrato de carbono digitoxosa (2,6-didesoxi-D-ribo-hexosa). Esta 2,6-didesoxi-hexosa se ha encontrado en la naturaleza sólo en plantas del género Digitalis.



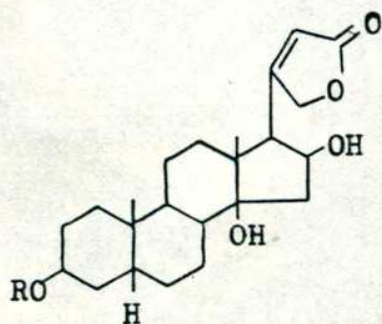
R: digitoxosa, Digitoxina (2)

R:H, Digitoxigenina (1)



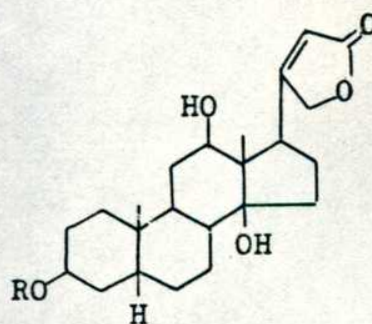
Digitoxosa

Además de digitoxina (2), se han encontrado en plantas de este género los glicósidos gitoxina (3) y digoxina (4), formados por las respectivas agliconas gitoxigenina (5) y digoxigenina (6) y el hidrato de carbono digitoxosa.



R: digitoxosa, Gitoxina (3)

R:H, Gitoxigenina (5)



R: digitoxosa, Digoxina (4)

R:H, Digoxigenina (6)

La biosíntesis de estos glicósidos ha sido estudiada con cierto detalle, existiendo trabajos de recopilación al respecto ^{11, 12}.

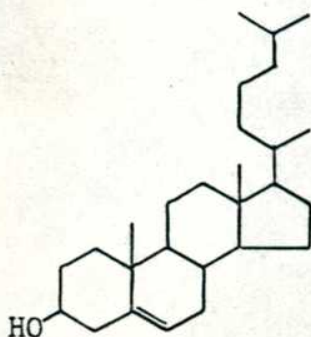
El objeto de este trabajo, como se detallará más adelante, fue tratar de esclarecer los últimos pasos de la biosíntesis de estos glicósidos, particularmente la formación y cierre del anillo lactónico. Esto involucró la síntesis de compuestos estructuralmente relacionados con el producto natural, algunos de los cuales no se encuentran descritos en la literatura, los que fueron preparados mediante métodos que permitieron la introducción en la molécula de marcaciones con isótopos radiactivos. Posteriormente se administraron estos productos marcados con carbono 14 a plantas Digitalis purpurea, aislando los glicósidos y determinando, por degradación, la localización de la marca.

**PROPOSITOS
DE ESTA
INVESTIGACION**

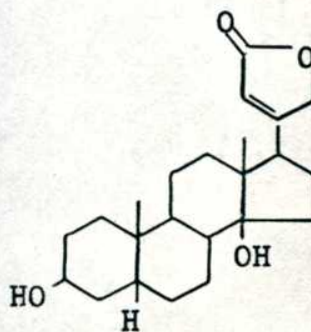
Antecedentes

Es conocido el papel central que desempeña el colesterol en la biosíntesis de compuestos esteroidales, tanto en animales como en vegetales. Ya desde la década del 60 resultó aparente que el colesterol, lejos de ser un metabolito exclusivo del reino animal, estaba ampliamente distribuido en vegetales. De ello que en estos organismos, distintos caminos biosintéticos conducentes a compuestos esteroidales pueden iniciarse, al igual que en tejidos animales, en el colesterol o en alguno de sus productos de degradación conocidos, ésto es ácidos biliares, pregnanos o androstanos.

De la observación de las fórmulas estructurales del colesterol (7) y de un cardenólido como la digitoxigenina (1) es dable presumir que la biogénesis de este tipo de geninas puede tener su origen en colesterol.



7



1

De esa observación no quedarían dudas, a priori, que tal posibilidad es particularmente factible para el sistema tetracíclico esteroideal, pudiendo quedar dudas sobre el proceso que con-

duciría a la formación, *in vivo*, del anillo butenólido del cardenólido.

Es de apreciar que para la transformación del sistema tetraclico del colesterol en su similar de un cardenólido, deberán producirse un reducido número de transformaciones, fundamentalmente el cambio de conformación entre anillos A/B y C/D (en ambos casos *cis*) con la concomitante introducción, en este último caso, de un grupo hidroxilo en C-14 con orientación β .

En 1955, Tschesche ¹³ había sugerido que el anillo lactónico de los cardenólidos se formaba por reacción de dos moléculas de ácido acético, presumiblemente activadas como acetil-Coenzima A, con un ácido etiánico a, como se indica en la figura 2:

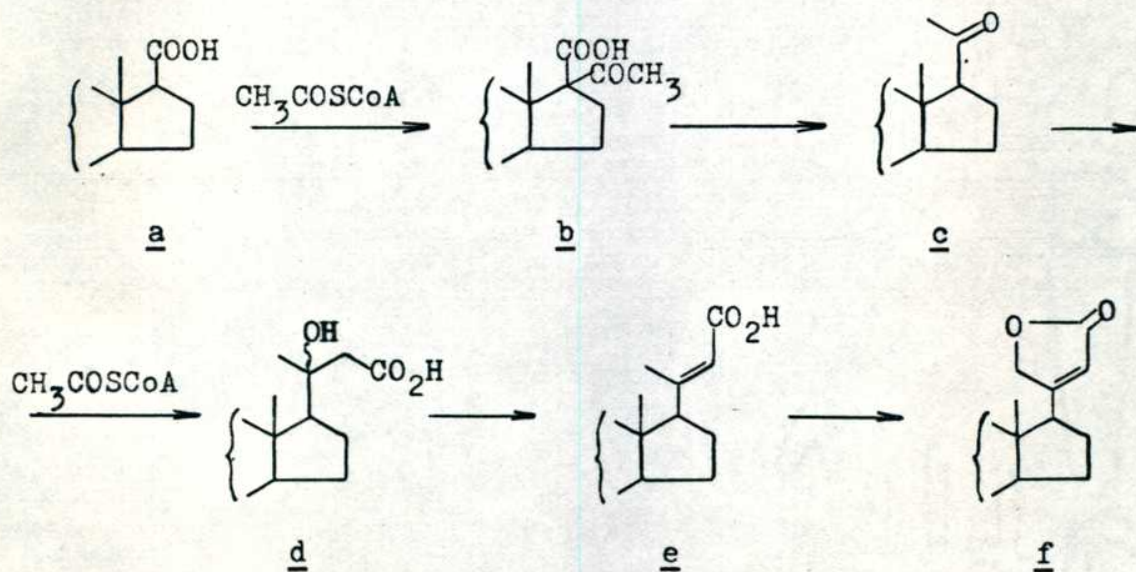


Figura 2: Hipótesis para la formación del anillo butenólido.

La reacción de acetil-Coenzima A con el ácido etiánico a

produciría un β -cetoácido b, el cual descarboxilaría a un derivado de pregnano c. La reacción de esta cetona con una molécula adicional de acetil-Coenzima A daría el β -hidroxiácido d. El ácido α,β no saturado e, obtenido por deshidratación de d, conduciría, por una oxidación alílica del grupo metilo de C-21, al ácido γ -hidroxi- α,β -insaturado resultante, el cual lactonizaría al anillo butenólido f.

El primer estudio de biosíntesis de cardenólidos utilizando compuestos isotópicamente marcados fue realizado por Gregory y Leete ¹⁴, quienes en 1960 consideraron como hipótesis de trabajo que, en plantas del género Digitalis, la digitoxigenina se podría formar a partir de escualeno, vía colesterol o algún esteroide o triterpeno muy relacionado.

Para probar esta hipótesis administraron ácido mevalónico-(2-¹⁴C) (8) a ejemplares de esa planta, esperando aislar digitoxigenina (1) marcada como se indica con puntos oscuros en la figura 3:

• = ¹⁴C

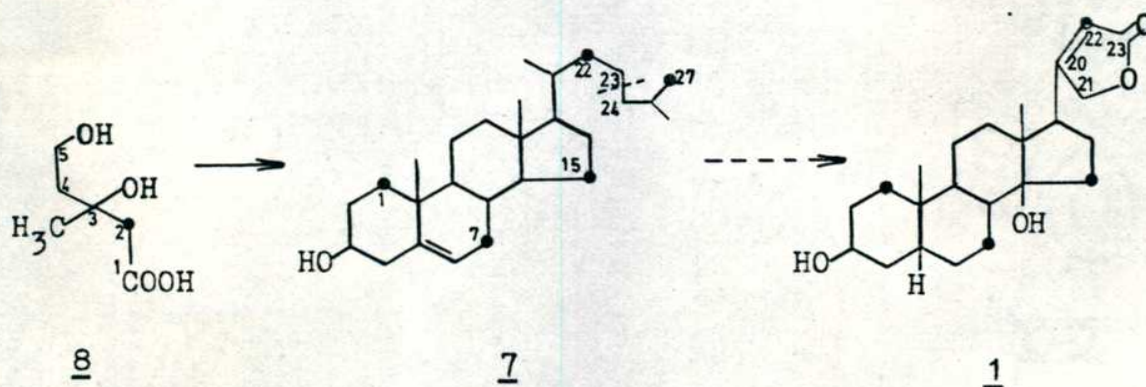


Figura 3: Hipótesis original para la biosíntesis de digitoxigenina.

Los autores suponían que el anillo lactónico se formaría a partir de la cadena lateral de colesterol (7) por ruptura del enlace entre C-23 y C-24. Sin embargo, por degradación de la digitoxigenina aislada de la planta, encontraron que la radiactividad estaba localizada únicamente en el esqueleto esteroide, mientras que los fragmentos obtenidos a partir del anillo lactónico carecían de radiactividad.

Posteriormente, Leete et al. ¹⁵ administraron acetato de sodio-(1-¹⁴C) a plantas Digitalis purpurea. Obtuvieron digitoxigenina radiactiva y por degradación del anillo butenólido, encontraron significativa radiactividad en C-20 y C-23 y esencialmente ninguna radiactividad en C-21 y C-22 (ver figura 4). Había además, considerable marca en el núcleo esteroide, lo cual era previsible ya que, acetato es precursor de ácido mevalónico.

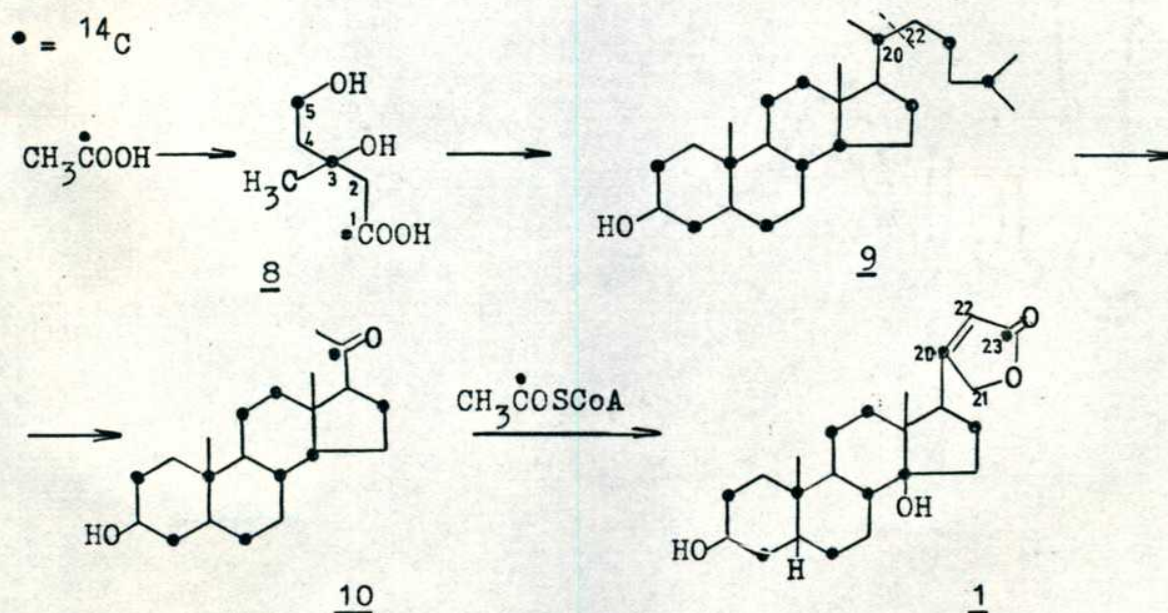


Figura 4: Hipótesis alternativa para la biosíntesis de digitoxigenina.

Estos resultados eran consistentes con la hipótesis de Tschesche (figura 2) para la formación del anillo butenólido. Sin embargo, para la formación del anillo lactónico existía una ruta intermedia, la que también había sido discutida en el esquema general de Tschesche ¹³ (figura 2) y que consistía en la condensación de una molécula de acetato (como acetil-CoA) con un intermediario tipo 20-ceto-pregnano (ruta c → f en la figura 2).

Los resultados obtenidos por Leete et al. ¹⁵ también podían adaptarse al camino intermedio señalado. El ácido mevalónico-(1,3,5-¹⁴C) (8) derivado de acetato-(1-¹⁴C) puede ser precursor, vía escualeno, del esteroide 9, cuya cadena lateral puede sufrir una ruptura entre C-20 y C-22 para conducir a un derivado de tipo 20-ceto-pregnano 10, el que debería estar marcado en C-20. La reacción de 10 con una molécula de acetato-(1-¹⁴C), activada como acetil-Coenzima A, daría el anillo butenólido marcado en C-20 y C-23 (1).

En 1964, Reichstein et al. ¹⁶ administraron ácido mevalónico -(3-¹⁴C) a plantas Digitalis lanata y aislaron digitoxigenina radiactiva, la cual tenía una cantidad significativa de radiactividad localizada en C-20. Esta experiencia también está de acuerdo con la hipótesis de un intermediario tipo pregnano (figura 4), ya que el ácido mevalónico-(3-¹⁴C) marcaría al posible 20-ceto-pregnano en los carbonos 4, 8, 10, 14 y 20.

Por otro lado, Tschesche y Lilienweiss ¹⁷ administraron el 3 β -D-glucopiranosido de pregnenolona-(21-¹⁴C) a plantas Digitalis lanata y aislaron digitoxigenina radiactiva, conteniendo

un 2,2 % de la actividad del precursor administrado. Posteriormente, Tschesche et al.¹⁸ informaron sobre el hallazgo de derivados de tipo 20-ceto-pregnano en plantas Digitalis y especies relacionadas, aportando datos confirmativos indirectos para el mecanismo biosintético propuesto.

En base a estos resultados y a trabajos realizados por otros autores¹⁹, parece no haber dudas sobre la presencia de un intermediario tipo 20-ceto-pregnano en el camino biosintético conducente a cardenólidos en plantas del género Digitalis.

Resta aún aclarar cuál es la naturaleza del pregnano involucrado y en qué orden deberían producirse algunas de las principales modificaciones en el esqueleto esteroideal y en la cadena lateral para llegar a un glicósido cardenólido. Entre estas modificaciones tenemos:

- 1) saturación del doble enlace de C-5 con la concomitante producción de un sistema con configuración A/B cis.
- 2) introducción de un grupo hidroxilo en C-14 con configuración β .
- 3) formación del anillo butenólido.
- 4) introducción de grupos hidroxilo en C-12 y C-16 con la configuración adecuada, para dar lugar a la formación de digoxigenina (6) y gitoxigenina (5), respectivamente.
- 5) introducción de tres moléculas de digitoxosa para formar los respectivos glicósidos digitoxina (2), gitoxina (3) y digoxina (4).

Con respecto al punto 1), se ha sugerido²⁰ que la saturación del alcohol homoalílico (Δ^5 -3 β -ol) en pregnenolona, por

ejemplo, podría proceder como sucede en animales, vía oxidación e isomerización de ese sistema a otro del tipo 3-ceto- Δ^4 , el cual es luego reducido con la orientación requerida (figura 5).

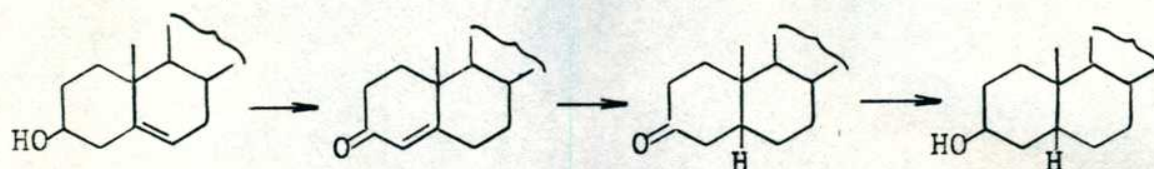
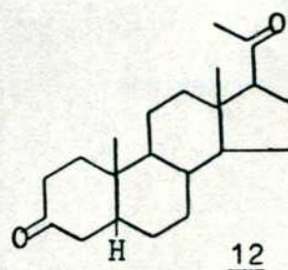
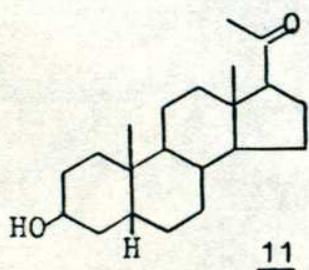


Figura 5: Pasos probables para la saturación del alcohol homoalfílico (Δ^5 -3 β -ol).

Caspi y Lewis ²⁰ confirmaron que la progesterona es un precursor de cardenólidos y por valores relativos de incorporación establecieron que resultaba más eficaz que la pregnenolona. Por su parte, Bennett et al. ²¹ aislaron 5 β -pregnanolona (11) radiactiva al administrar progesterona marcada a plantas del género Digitalis. Por otra parte, Tschesche et al. ²², encontraron que 5 β -pregnanolona (11) y 5 β -pregnan-3,20-diona (12) se



metabolizan a cardenólidos en Digitalis lanata. Sin embargo, los valores de incorporación hallados no permitieron determinar con seguridad en qué orden se encuentran ambos metabolitos en el camino biosintético.

Finalmente, varias observaciones en este campo conducen a la conclusión de que la saturación del doble enlace de C-5 se produce en una de las primeras etapas del camino biosintético.

Con respecto a la hidroxilación en C-14 con orientación β , hasta el momento todos los esfuerzos destinados a clarificar su introducción con la referida estereoisomería no han tenido éxito.

Caspi et al. ²³ plantearon, como hipótesis, que la introducción del grupo hidroxilo 14β podía proceder según las siguientes etapas (figura 6):

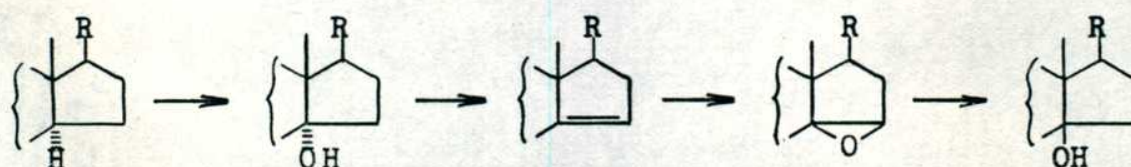


Figura 6: Hipótesis para la introducción del grupo hidroxilo 14β .

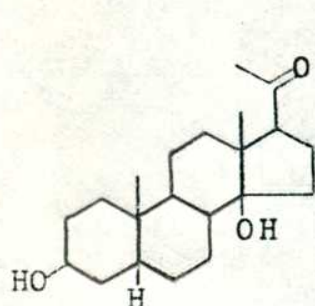
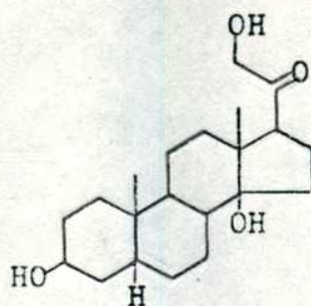
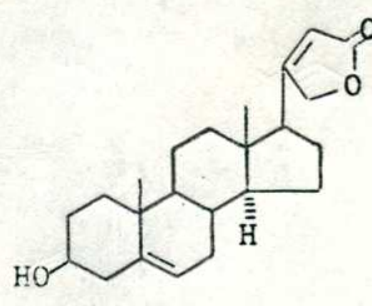
Es decir, en una primera etapa se produciría una hidroxilación en C-14 con retención de la configuración (α) del hidrógeno saliente. Por deshidratación de este intermediario se

obtendría un compuesto con un doble enlace en posición 14, el que sufriría una epoxidación orientada β para finalmente conducir, por apertura del epóxido, al grupo hidroxilo 14 β .

Se han realizado una serie de ensayos cuyos resultados contradicen esta hipótesis. Los mismos autores ²³ encontraron que la 14 α -hidroxi-progesterona no actuaba como intermediario en la biosíntesis de digitoxigenina. Este resultado descartaría una inversión del grupo hidroxilo 14 α a 14 β . Por otro lado, Tschesche et al. ^{22,24} demostraron que compuestos con un doble enlace en posición 14 tampoco eran precursores de cardenólidos en plantas Digitalis.

En experiencias realizadas administrando precursores triados en C-15, Canónica et al. ²⁵ encontraron que los cardenólidos aislados conservaban la marca en C-15, descartando toda participación de un intermediario con un doble enlace en posición 14(15). Posteriormente, Aberhart y Caspi ²⁶ propusieron, como alternativa, un intermediario con un doble enlace en posición 8(14) pero no realizaron experiencias para su confirmación.

Los únicos resultados concretos, hasta el momento, señalan que la hidroxilación en 14 β ocurre en la etapa de pregnano, antes de la construcción del anillo butenólido. Esta conclusión está avalada por las incorporaciones de 3 β ,14 β -dihidroxi-5 β -pregnanolona (13) ²⁴ y 3 β ,14 β ,21-trihidroxi-5 β -pregnanolona (14) ²⁷ en cardenólidos, y por la demostración de que la Δ^5 -14-desoxi-14 α -digitoxigenina (15) ²⁴ no está en el camino biosintético.

131415

Con respecto al orden en que se realizan las hidroxilaciones en el núcleo esteroideal en C-12 y C-16, con orientación β , para dar lugar a digoxigenina y gitoxigenina, respectivamente, no se pueden sacar conclusiones definitivas, ya que no se conoce con seguridad si estos pasos se producen en la etapa de 21C (pregnano) o en la de 23C (con anillo lactónico formado). Con respecto a este último punto, Tschesche ²⁷ demostró que, en plantas Digitalis, la digitoxigenina se hidroxila en posición 12 β transformándose en digoxigenina, pero la hidroxilación en C-16 para formar gitoxigenina se produce en muy pequeña proporción. Por otra parte, administrando 14 β -hidroxi-progesterona, el rendimiento es alto en gitoxigenina y bajo en digoxigenina ²⁸.

Parece ser, entonces, que la hidroxilación en C-16 para dar gitoxigenina sucedería primordialmente en la etapa de 21C (pregnano), no así la hidroxilación en C-12 que puede ocurrir sobre digitoxigenina formada.

Por otra parte, es de hacer notar que 3 β ,12 β -dihidroxi-5 β -pregnanolona (16) se convierte biosintéticamente en digoxigenina (6) ²², indicando que la misma se puede biosintetizar por

dos caminos distintos, tal como se indica en la figura 7:

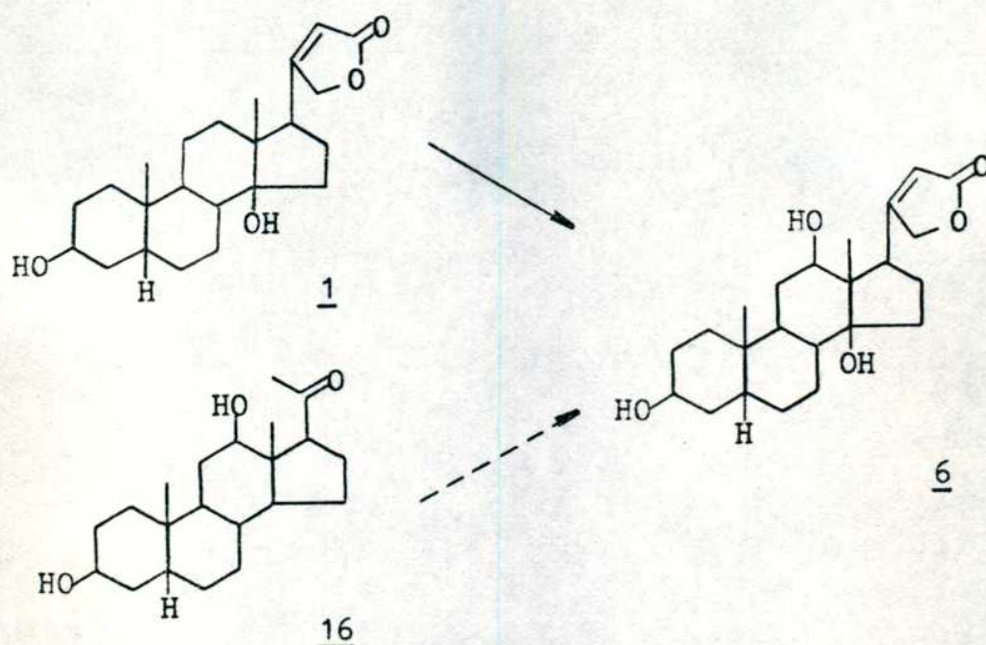


Figura 7: Posibles rutas de biosíntesis de la digoxigenina (6).

Otros resultados con precursores marcados conducen a la conclusión que las hidroxilasas necesarias para la mayoría de estas transformaciones, posiblemente no sean específicas. Por lo tanto, un compuesto que normalmente no se encuentra en el camino biosintético puede ser transformado, en forma alternativa, en la molécula deseada, produciendo la formación in vivo de un dado producto por una ruta biosintética inespecífica.

Resumiendo en forma general los resultados obtenidos, Tschesche et al.²² sugieren, para la biosíntesis de cardenólidos en plan-

Objetivos específicos

Como se había expresado previamente, en los pasos finales de la biosíntesis de cardenólidos en plantas del género Digitalis restaban aclarar dos puntos importantes.

Uno de ellos era el proceso de hidroxilación en posición 14 β y el restante lo constituía la secuencia de funcionalizaciones sobre el derivado 20-ceto-pregnano, es decir, la hidroxilación de C-21, la condensación con una molécula de acetato (activada como acetil-CoA) y el posterior cierre del anillo lactónico.

En la figura 9 se resumen los caminos alternativos por los cuales podría arribarse al anillo butenólido:

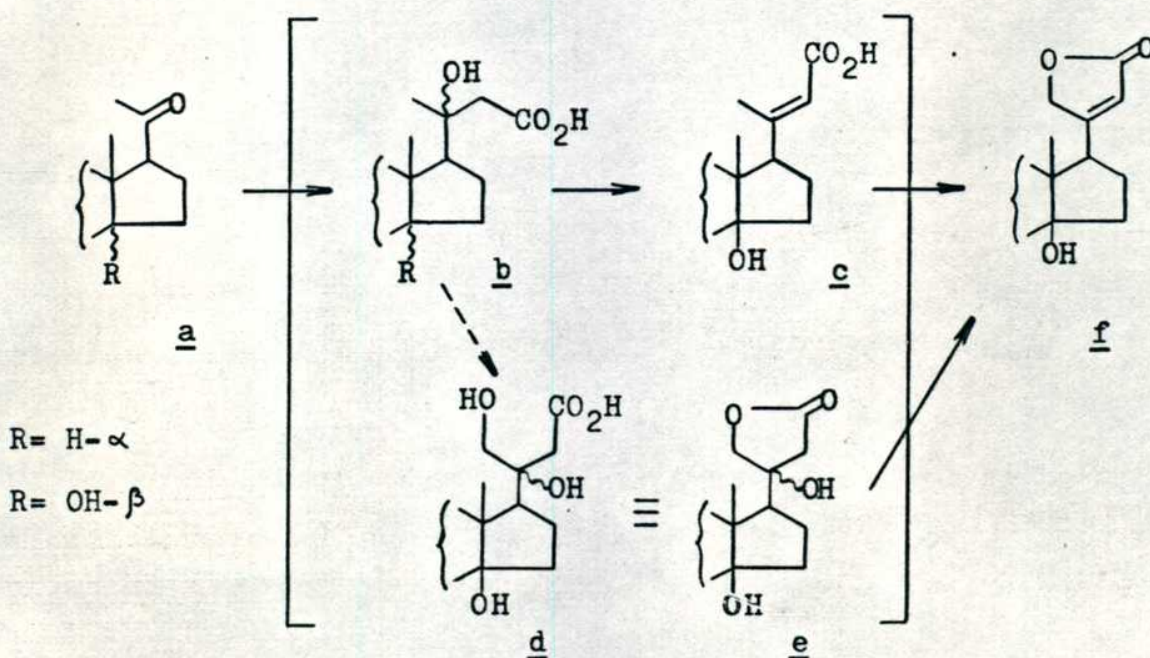


Figura 9: Caminos alternativos para la biosíntesis del anillo butenólido.

En una primera secuencia, la condensación de una molécula de acetil-CoA con una molécula de un 20-ceto-pregnano a daría origen a un intermediario del tipo de un β -hidroxiácido b, el cual podría alternativamente deshidratar a un ácido α,β no saturado c, para luego experimentar una hidroxilación en C-21 y ciclar al anillo butenólido f.

Como se ha comprobado que la hidroxilación en posición 14 β es previa a la formación del anillo lactónico, podría ocurrir que en los pasos anteriores a la hidroxilación en C-21 la posición 14 aún no estuviera hidroxilada, pero dado que la hidroxilación en C-21 inmediatamente produciría la lactona, será siempre necesario que la hidroxilación en C-14 se produzca con antelación a la correspondiente en C-21.

Por otro lado, la hidroxilación en C-21 podría ser previa a la deshidratación. En ese caso, el precursor d ya debería estar hidroxilado en posición 14 β , ya que un intermediario de este tipo (dibujado sólo con fines prácticos) ciclaría inmediatamente dando la lactona e. Por una posterior deshidratación, e daría el anillo α,β -insaturado (butenólido) f.

El propósito del presente trabajo era investigar la posible participación de intermediarios de tipo β -hidroxiácido b, los que estarían listos para ciclar mediando la mencionada hidroxilación en C-21. Si intermediarios de este tipo se incorporan en cardenólidos, entonces la hidroxilación en C-21, previa a la condensación con una molécula de acetato, sería un camino alternativo. Si no hubiese incorporación, quedaría fehaciente-mente confirmado que la hidroxilación en C-21 es previa a la

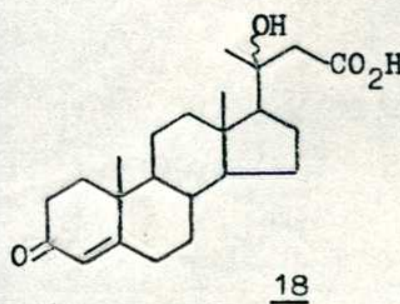
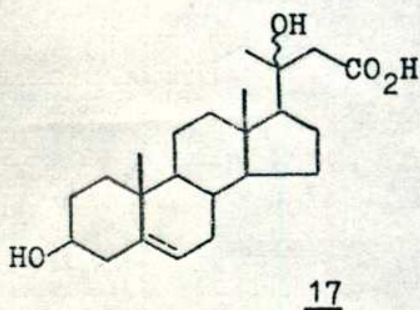
condensación con una molécula de acetato.

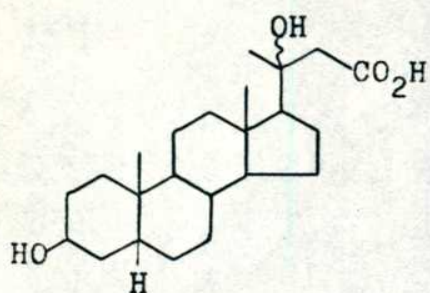
Por otra parte, a fin de confirmar la posibilidad de que la formación del doble enlace del anillo butenólido fuera anterior a la hidroxilación en C-21, se programaron las síntesis y pruebas in vivo con intermediarios conteniendo esta clase de cadena, es decir, compuestos de tipo c.

Como se desconoce en qué etapa de modificación del esqueleto esteroidal se produce la condensación del acetato con el 20-ceto-pregnano, se planteó la posibilidad de preparar distintos esteroides cuya característica común fuera la cadena lateral, tanto de tipo b como de c, y cuyas diferencias radicaran en la estructura del esqueleto esteroidal.

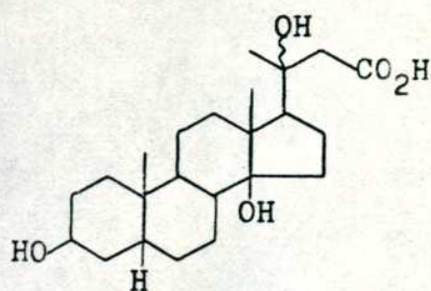
A continuación se presentan las dos series de compuestos que se programó sintetizar con el objetivo de investigar sus probables participaciones en el proceso biosintético de cardenólidos, en particular en lo que concierne a la formación del anillo butenólido, característico de estos productos naturales:

a) compuestos con cadena lateral tipo β -hidroxiácido



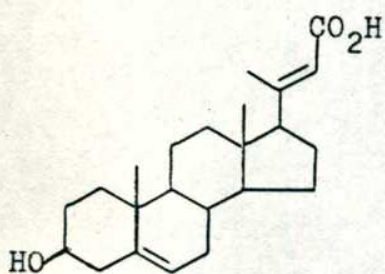


19

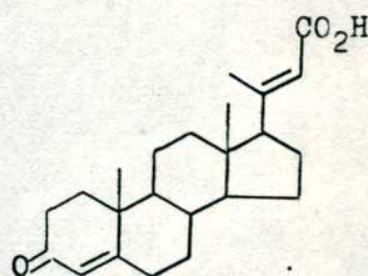


20

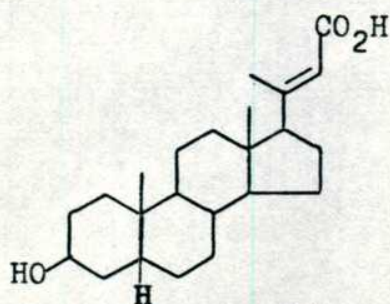
b) compuestos con cadena lateral de ácido α, β no saturado



21



22



23

3

**DESCRIPCION
DE LA LABOR
REALIZADA**

A. Síntesis de ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos y 23-norcol-20(22)(E)-énicos

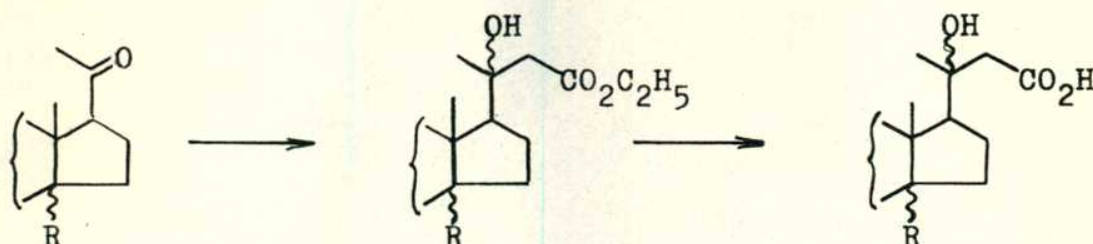
El propósito del presente trabajo fue investigar la posible participación de intermediarios con cadena lateral de tipo β -hidroxiácido y ácido α,β no saturado en el camino biosintético de los cardenólidos, tal como se propuso en la figura 9. Con ese objeto, se sintetizaron dos series de compuestos con marcación radiactiva en el C-24. Esta marcación debería hallarse en la estructura final de los cardenólidos, localizada en el C-23 de los mismos. Las dos series de compuestos sintetizados comprenden:

a) compuestos con cadena lateral tipo β -hidroxiácido

- ácido $3\beta,20(R,S)$ -dihidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C (17- ^{14}C)
- ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico-24- ^{14}C (18- ^{14}C)
- ácido $3\beta,20(R,S)$ -dihidroxi-23-nor-5 β -colánico-24- ^{14}C (19- ^{14}C)
- ácido $3\beta,14\beta,20(R,S)$ -trihidroxi-23-nor-5 β -colánico-24- ^{14}C (20- ^{14}C)

Estos compuestos presentan como característica común la cadena lateral proveniente de la reacción de un 20-ceto-pregnano con bromoacetato de etilo-(1- ^{14}C) y zinc, en condiciones

de la reacción de Reformatsky, y posterior hidrólisis del grupo éster etílico, tal como se indica en la figura 10:



R = H(α); OH(β)

Figura 10: Esquema de síntesis de la cadena lateral de ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos.

b) compuestos con cadena lateral de ácido α,β no saturado

- ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-24-¹⁴C (21-¹⁴C)
- ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico-24-¹⁴C (22-¹⁴C)
- ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-énico-24-¹⁴C (23-¹⁴C)

La cadena lateral de estos compuestos proviene de la deshidratación, con oxiclورو de fósforo en piridina, de los correspondientes ésteres etílicos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos, y posterior hidrólisis del grupo éster etílico (figura 11):

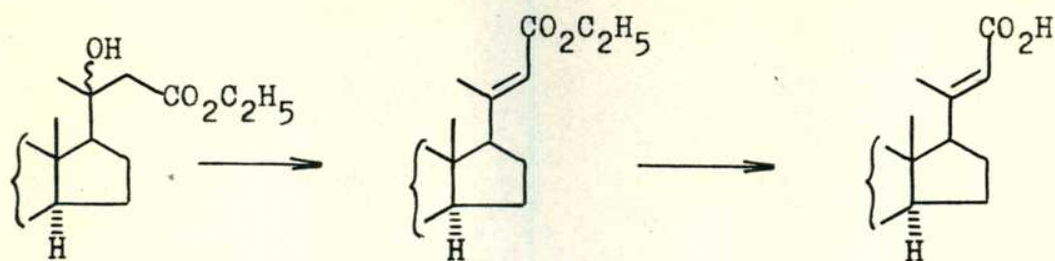
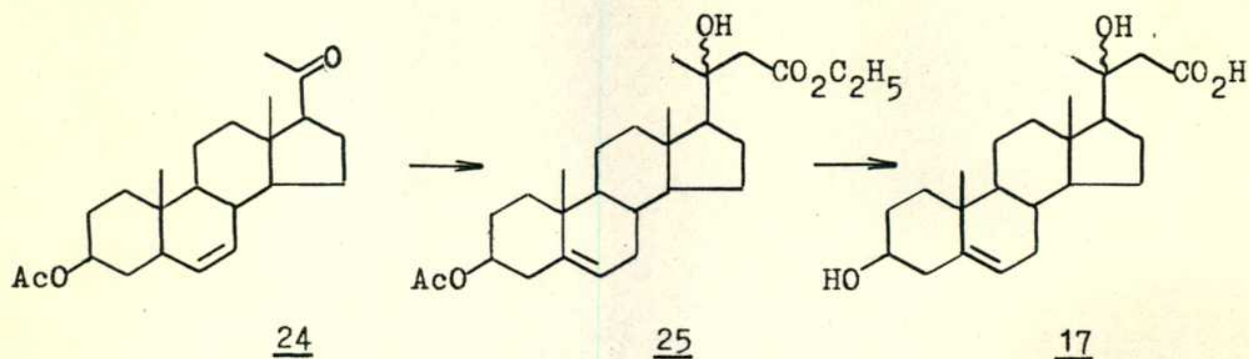


Figura 11: Esquema de síntesis de la cadena lateral de ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos.

1. a.- Síntesis del ácido $3\beta,20(R,S)$ -dihidroxi-23-norcol-5-
-énico (17)

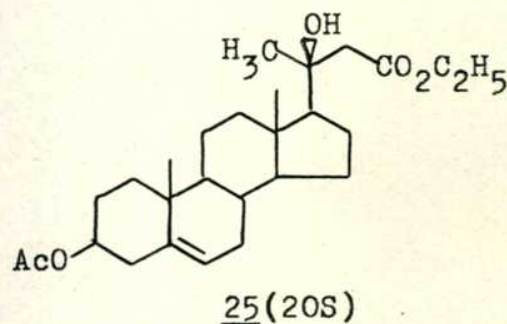
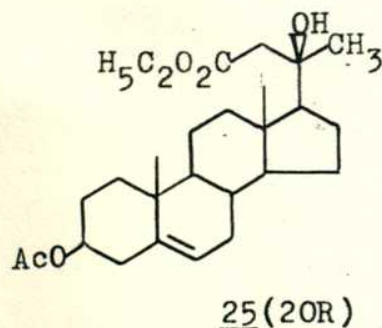


La reacción de acetato de pregnenolona (24) con bromoacetato de etilo y zinc, en benceno, en condiciones de la reacción de Reformatsky, y la posterior acetilación, dio como producto el éster etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico (25)³⁰. Este producto resultó ser una mezcla de los diasterómeros 20R y 20S. La presencia de ambos epímeros fue determinada mediante espectroscopía de resonancia magnética protónica (RMN-¹H), observando el valor del desplazamiento químico de los protones de C-21, el que depende de la configuración de C-20³¹. Esta diferencia en el desapantallamiento sufrido por los protones del grupo metilo de C-21, en los epímeros 20R y 20S, ya había sido observada por Lieberman et al.³², los que analizaron los espectros de RMN-¹H de los epímeros 20R y 20S de $3\beta,20$ -dihidroxi-colest-5-enos y de sus correspondientes 3β -acetoxi derivados. Utilizando modelos moleculares, observaron que la rotación alrededor del enlace C-17/C-20 está parcialmente impedida por efecto estérico. Esto significa que el entorno electrónico

de los protones del grupo metilo de C-21 de uno de los epímeros es, en promedio, distinto del que rodea a los protones de C-21 del otro epímero, observando un desplazamiento a campos más bajos en los isómeros 20S.

En nuestro caso, la mezcla 25(20R+20S), la cual presentaba un solo pico por cromatografía gas-líquido (CGL), fue separada por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), en las condiciones descriptas en la Parte Experimental.

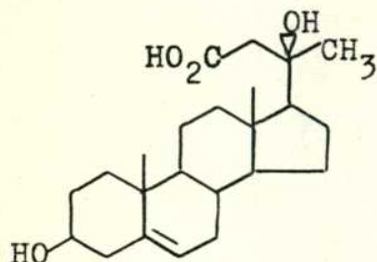
Se identificó a cada epímero mediante su correspondiente espectro de RMN-¹H, observando el valor del desplazamiento químico de los protones de C-21. En el epímero 25(20R) estos protones presentan un valor de desplazamiento químico de 1,28 ppm, mientras que en el epímero 25(20S) este valor es de 1,36 ppm.



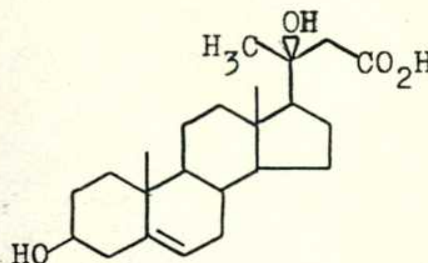
Conocidos estos valores, se pudo asignar la señal del grupo metilo de C-21 correspondiente a cada epímero, en el espectro de RMN-¹H de la mezcla.

En la mezcla 25(20R+20S), el epímero 20S es el que se encuentra en mayor proporción (62%), según resultó de la integración de las áreas de los picos del cromatograma correspondiente a la separación por CLAR.

Por hidrólisis del compuesto 25 se obtuvo el ácido 3β , 20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico (17), también como mezcla de los epímeros 17(2OR) y 17(2OS).



17(2OR)

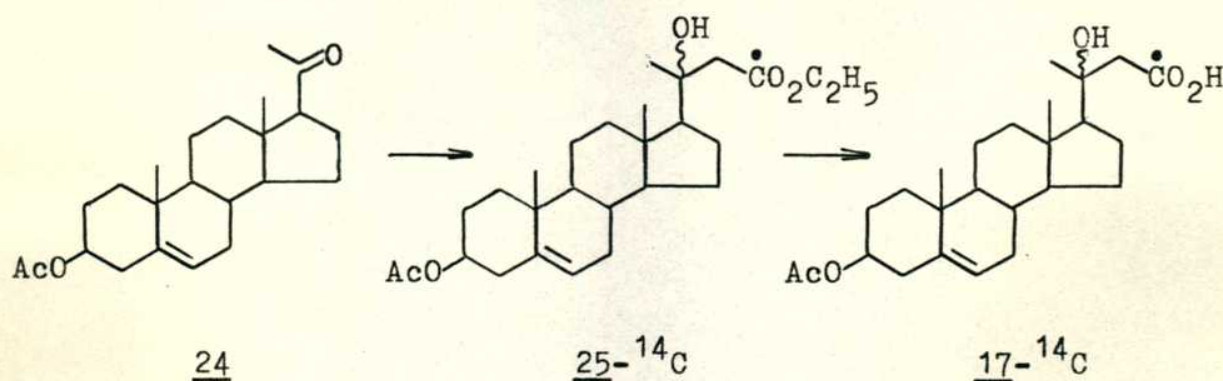


17(2OS)

En un principio, se había intentado separar la mezcla 17 (2OR+2OS) por cromatografía en capa delgada (CCD), y posteriormente por CLAR, pero ninguno de los dos métodos probados resultó exitoso. En cambio sí lo fue la separación de la mezcla de los ésteres etílicos 25(2OR+2OS), tal como se describió anteriormente, por lo que, para obtener los ácidos individuales, se debía proceder a separar la mezcla de ésteres y llevar a cabo las respectivas hidrólisis. En el caso del epímero 25(2OS) se obtuvo el ácido correspondiente 17(2OS). En el espectro de RMN-¹H del mismo, la señal de los protones del grupo metilo de C-21 aparece a 1,78 ppm. Este dato permitió asignar la señal de los protones del grupo metilo de C-21 del epímero 17(2OR) en el espectro de RMN-¹H de la mezcla 17(2OR+2OS), la que aparece a 1,60 ppm. Al igual que en el caso de los ésteres etílicos 25(2OR) y 25(2OS), se observa un desplazamiento de dicha señal hacia campos más bajos en el epímero 2OS respecto del corres-

pondiente epímero 20R.

1. b.- Síntesis del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C (17- ^{14}C)

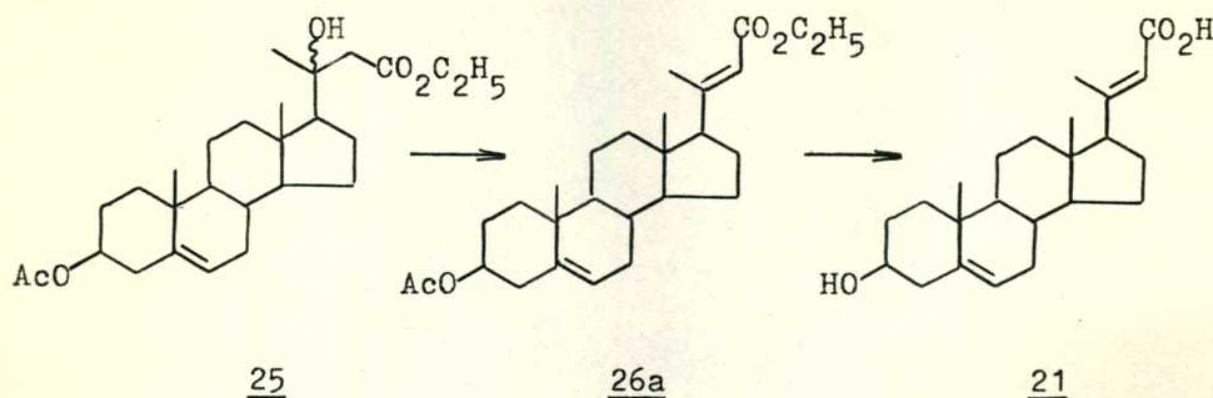


En la síntesis del compuesto $\text{17-}^{14}\text{C}$ el reactivo limitante era el bromoacetato de etilo marcado con ^{14}C en el carbono carboxílico. Por lo tanto, se debía trabajar en pequeña escala, lo cual implicó la adecuación del equipo donde se realizaba la reacción y un cuidadoso control de las condiciones de la misma, para obtener un rendimiento aceptable.

Se partió de acetato de pregnenolona (24), el que se hizo reaccionar con bromoacetato de etilo-(1- ^{14}C). Se aisló el éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C ($\text{25-}^{14}\text{C}$) con un rendimiento del 94%, y se lo recrystalizó hasta actividad constante.

La hidrólisis en medio alcalino, tal como se describió para el compuesto 25 , rindió el ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C ($\text{17-}^{14}\text{C}$), con un rendimiento del 81%. Este se recrystalizó de acetona hasta actividad constante.

2. a.- Síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-
-diénico (21)

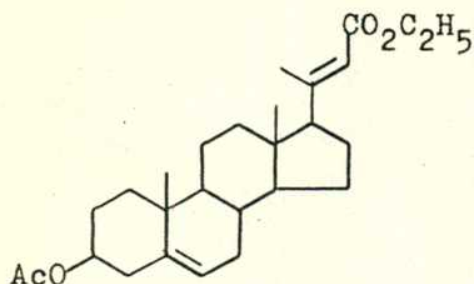
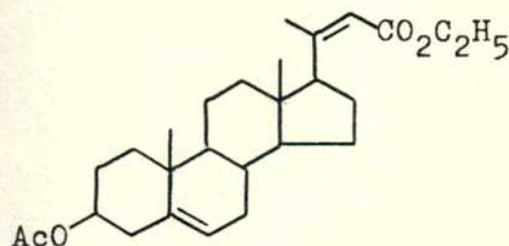
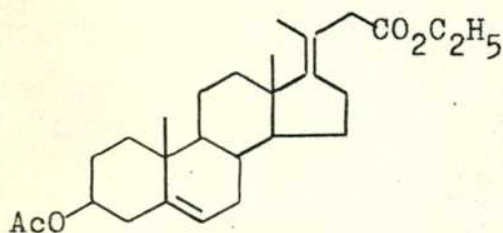
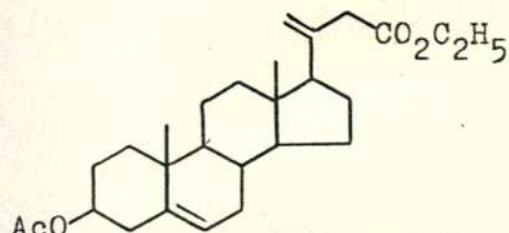


Para la síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (21) se partió del compuesto 25 y se eligió una secuencia de deshidratación y posterior hidrólisis del éster etílico y del grupo protector del hidroxilo de C-3.

Las reacciones de deshidratación de esteroides 20-hidroxiados dan como producto de reacción mezclas de las olefinas isoméricas $\Delta^{17(20)}$, Δ^{20} y $\Delta^{20(22)}$, en proporciones variables que dependen de las condiciones de reacción³³. Cuando se usa cloruro de tionilo en piridina predominan los isómeros $\Delta^{17(20)}$, E y Z; mientras que cuando el reactivo deshidratante es oxícloruro de fósforo se obtienen principalmente los isómeros $\Delta^{20(22)}$, E y Z.

La reacción del compuesto 25 con oxícloruro de fósforo en piridina rindió una mezcla de isómeros, según se determinó por espectroscopía de RMN-¹H. Los componentes de la mezcla fueron identificados como los ésteres etílicos de los ácidos 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (26a), 3 β -acetoxi-23-norcola-5,

20(22)(Z)-diénico (26b), 3 β -acetoxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (26c) y 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20-diénico (26d):

26a26b26c26d

En el espectro de RMN- ^1H del producto de reacción, el análisis de las señales correspondientes a los protones de C-21 y C-22 permitió individualizar aquellas correspondientes a cada uno de los isómeros. Los compuestos con un doble enlace en posición 20(21) presentan un doblete característico a δ 4,70 - 4,90 ppm debido a los protones vinílicos de C-21, mientras que el protón vinílico de C-22 en las olefinas con un doble enlace en posición 20(22) aparece como un multiplete a δ 5,10 ppm ³³. En nuestro caso, el isómero 26d presenta un doblete a 4,96 ppm,

mientras que los isómeros 26a y 26b presentan un multiplete a 4,68 y 5,78 ppm, respectivamente. Sus desplazamientos a campos más bajos, respecto a los determinados para los productos de deshidratación de 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-colest-5-enos ³³ se deben a la presencia del grupo éster etílico.

Se ha observado que en los 3β -acetoxi-colesta-5,17(20)-dienos, el grupo metilo de C-21 aparece como un triplete a δ 1,67 ppm ³⁴. En nuestro caso, el isómero 26c presentaba un triplete a 1,76 ppm.

Por otra parte, en ésteres α,β no saturados que poseen un grupo metilo unido al carbono olefínico β , el valor del desplazamiento químico del grupo metilo puede ser utilizado para establecer la estereoquímica del doble enlace ³⁵. Esto se basa en que los protones de un grupo metilo cis al sustituyente alcóxicarboxílico del doble enlace, sufren un desapantallamiento prácticamente constante del orden de 0,25 ppm, con respecto a los del otro isómero.

Estas consideraciones son aplicables a las cadenas laterales de los isómeros 26a y 26b. En el caso del isómero E (26a), el grupo metilo de C-21 se encuentra ubicado del mismo lado del doble enlace que el grupo éster, y por lo tanto, sufre un desapantallamiento de 0,27 ppm con respecto al grupo metilo de C-21 del isómero Z (26b). Los valores de desplazamiento químico de estos protones fueron de 2,18 ppm y 1,91 ppm para 26a y 26b, respectivamente.

Por recristalización de la mezcla se separó un isómero puro, el cual fue identificado como el compuesto 26a, mediante

el análisis de su espectro de RMN-¹H. Se determinó, además, con esta misma técnica espectroscópica, que el contenido de las aguas madres de la recristalización estaba constituido por una mezcla de los cuatro isómeros.

La mezcla fue separada en sus cuatro componentes (26a, 26b, 26c y 26d) por CLAR en las condiciones descriptas en la Parte Experimental, determinándose la composición porcentual de la misma por integración de las señales del cromatograma: isómero E (26a), 30%; isómero Z (26b), 20%; isómero $\Delta^{17(20)}$ (26c), 22% e isómero Δ^{20} (26d), 28%. Cada uno de los isómeros fue identificado por espectroscopía de RMN-¹H.

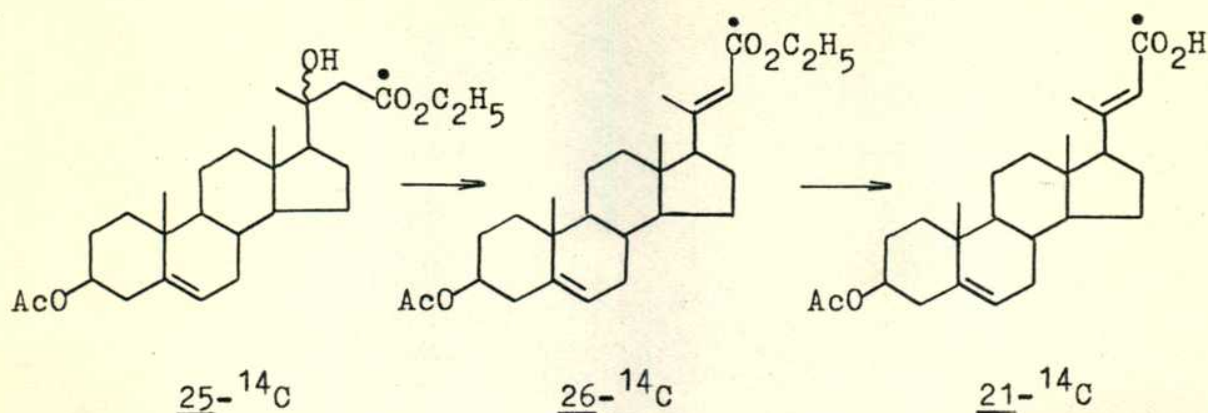
Dado que en el caso de la síntesis del producto radiactivo es particularmente importante no tener pérdidas de masa del compuesto 26a, se utilizó la técnica de CLAR para la separación de este isómero de los restantes presentes en la mezcla de reacción.

Una vez purificado el isómero 26a, se lo hidrolizó en medio alcalino, obteniéndose el ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (21).

2. b.- Síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-24-¹⁴C (21-¹⁴C)

Para la preparación del compuesto 21-¹⁴C, se hizo reaccionar el éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24-¹⁴C (25-¹⁴C) con oxicloruro de fósforo

en piridina anhidra.



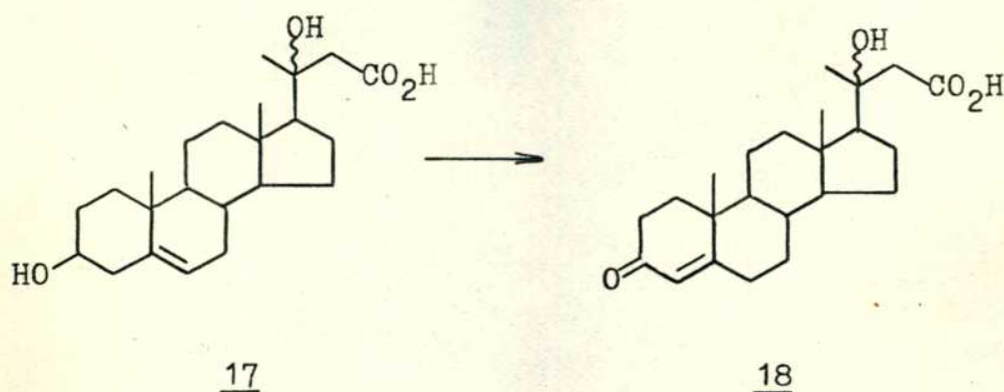
La mezcla de reacción conteniendo los cuatro isómeros, tal como había resultado en el ensayo no radiactivo, fue purificada por cromatografía en columna de alúmina, y posteriormente separada por CLAR, obteniendo el isómero E ($\underline{26a}\text{-}^{14}\text{C}$) con un rendimiento del 45%, el que se recrystalizó de etanol hasta actividad constante.

Por hidrólisis de $\underline{26a}\text{-}^{14}\text{C}$, en medio alcalino, se aisló el ácido 3β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-24- ^{14}C ($\underline{21}\text{-}^{14}\text{C}$), con un rendimiento del 90%, y se lo recrystalizó hasta actividad constante.

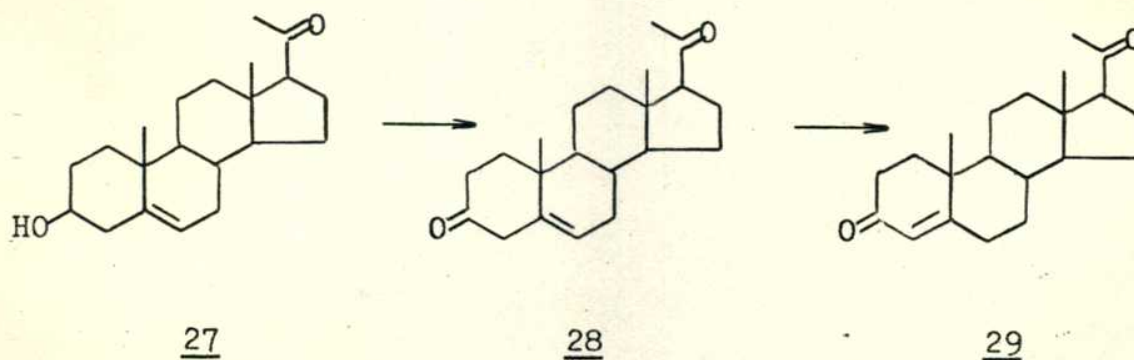
Los compuestos obtenidos presentaban propiedades físicas y espectroscópicas similares a sus análogos no radiactivos.

3. a.- Síntesis del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4- -énico (18)

La oxidación del grupo hidroxilo de C-3 y la isomerización del doble enlace en posición 5(6) del ácido $3\beta,20(R,S)$ -hidroxi-23-norcol-5-énico (17) se presentaba como la secuencia de síntesis más corta y sencilla para obtener el ácido 18.



Se probaron, entonces, distintos métodos de oxidación, utilizando pregnenolona (27) como compuesto modelo, ya que poseía el mismo esqueleto esteroide que el ácido 17.



Se probaron los siguientes reactivos de oxidación:

- 1) Reactivo de Jones ³⁶

Se preparó una solución al 2% de pregnenolona (27) en acetona y se le agregó el reactivo de Jones en un ligero exceso, tratando de controlar el avance de la reacción por CCD (sistema 1), a fin de evitar oxidaciones en otras posiciones del núcleo esteroideal. Luego de 15 minutos de reacción, se aisló un producto cuyo espectro infrarrojo presentaba banda de absorción de carbonilo y ausencia de hidroxilo. Sin embargo, su punto de fusión ($184-191^{\circ}$) era superior al de progesterona (29) ($121-123^{\circ}$) y al de pregn-5-en-3,20-diona (28) ($139-141^{\circ}$). Por espectrometría de masa se pudo determinar que, además del hidroxilo de C-3, había otra posición oxidada, presumiblemente una alílica.

2) Reactivo de Collins ³⁷

Se disolvió pregnenolona (27) en cloruro de metileno y se le agregó, gota a gota, el reactivo de Collins. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente. Se monitoreó la reacción por CCD (sistema 1) observándose una mancha cuyo Rf coincidía con el del testigo de progesterona (29) y una mancha muy intensa correspondiente al producto de partida. Esta situación no variaba al aumentar el tiempo de reacción.

3) Se probó nuevamente el reactivo de Jones, pero disminuyendo la relación de oxidante a sustrato ³⁶. Con estas condiciones de reacción se obtuvo la pregn-5-en-3,20-diona (28).

La isomerización del doble enlace de Δ^5 a Δ^4 fue lograda por calentamiento del producto de reacción disuelto en metanol, con una solución acuosa de hidróxido de potasio 10%, aislándose progesterona (29) como producto de reacción.

En base a los resultados obtenidos, se eligió para el proceso sintético que nos interesaba, el método de oxidación descrito en el punto 3). Para ello, se trató el ácido 17 con el reactivo de Jones, en las condiciones allí descritas. Se aisló una mezcla de reacción que presentaba varias manchas por GCD (sistema 2) y que resultó muy difícil de purificar. Variaciones en las condiciones de la reacción no condujeron a resultados satisfactorios ya que, evidentemente, la cadena lateral resultaba reactiva frente al oxidante.

Debido a esto, se decidió descartar al compuesto 17 como material de partida para la síntesis de 18 e intentar la misma a partir de progesterona (29). Para ello se debía proceder a una protección selectiva del grupo carbonilo de C-3 previa a la construcción de la cadena lateral mediante la reacción de Reformatsky sobre el grupo carbonilo de C-20. Dado que el grupo cicloetilendioxi podía ser conveniente para ese propósito, se ensayó la estabilidad de este protector en las condiciones de la reacción de Reformatsky. Esta prueba se hizo tratando 3 β -acetoxi-20,20-etilendioxi-pregn-5-en-20-ona con bromoacetato de etilo y zinc a reflujo en benceno anhidro, recuperándose el producto de partida inalterado. Dado que dicho grupo resultó estable frente al tratamiento indicado, se procedió a la protección selectiva, en dos pasos, de progesterona (29),

para luego efectuar la reacción de Reformatsky y finalmente desproteger el grupo carbonilo de C-3 y saponificar el éster etílico, tal como se muestra en la figura 12:

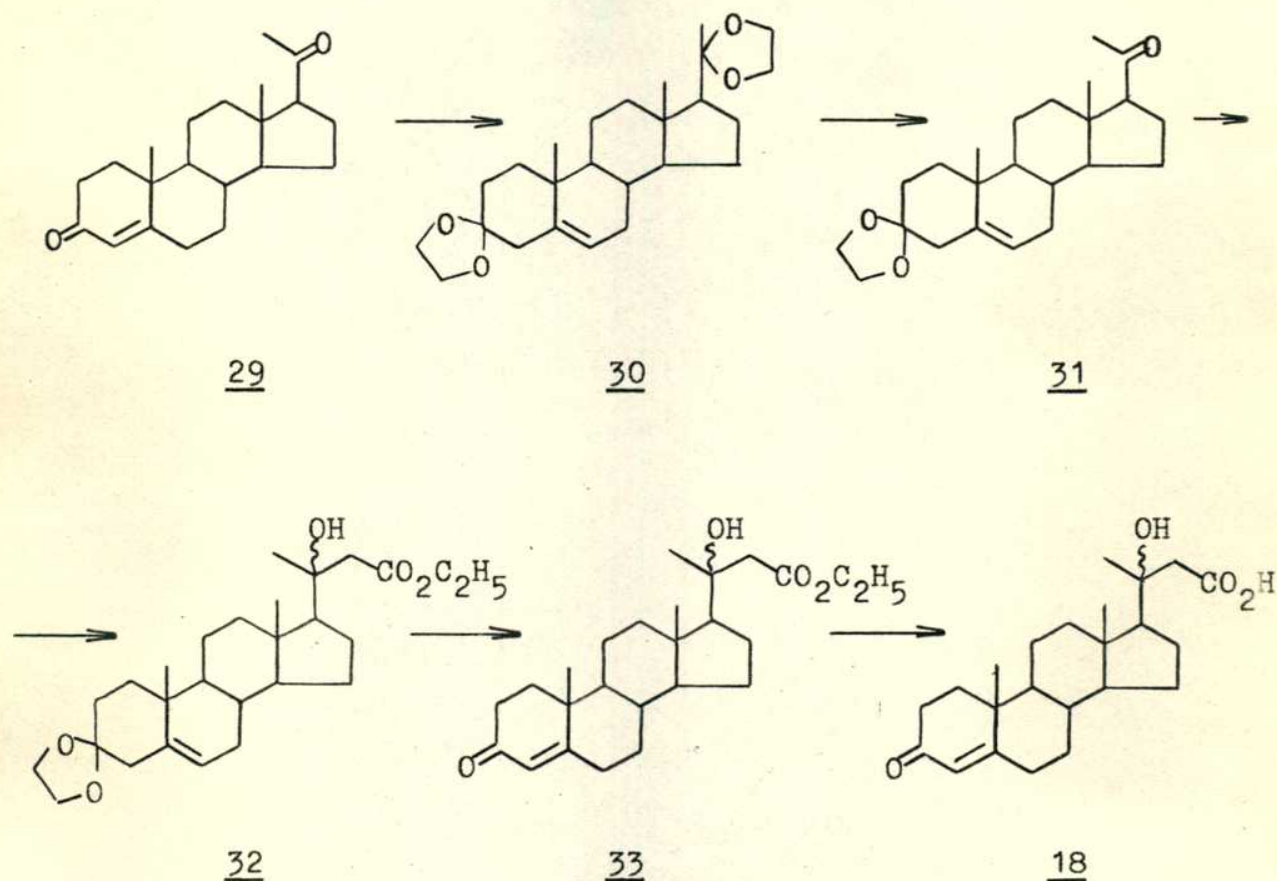


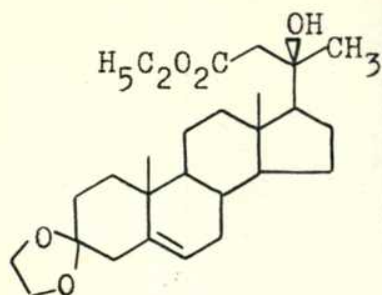
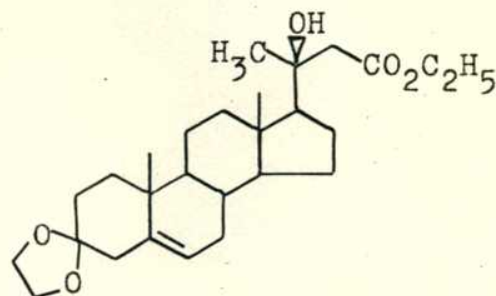
Figura 12: Esquema de síntesis de 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico (18).

Comenzando la secuencia programada, se disolvió progesterona (29) en tolueno y se trató con etilenglicol y ácido p-toluensulfónico. La reacción se llevó a cabo como se indica en la Parte Experimental, obteniéndose con muy buen rendimiento (94%), la 3,3;20,20-dietilendioxi-progesterona (30).

A continuación, se probaron dos métodos de hidrólisis selectiva del grupo cicloetilendioxo que protegía el carbonilo de C-20. El primero de ellos consistió en tratar el compuesto 30 con trifluoruro de boro éterato en una solución de éter etílico:benceno (1:1) ³⁸. Como producto de reacción se obtuvo una mezcla de tres compuestos, en distintas proporciones, según se estableció por CCD (sistema 3). Los componentes de la mezcla fueron identificados como progesterona (29), 3,3;20,20-di-etilendioxo-progesterona (30) y 3,3-etilendioxo-progesterona (31), mediante el análisis del espectro de RMN-¹H de la mezcla, observando los valores de los desplazamientos químicos correspondientes a los protones de los grupos metilo de C-18 y C-19. Aumentando el tiempo de reacción se logró aumentar la proporción del compuesto 31, pero igualmente se obtenía una mezcla de los tres compuestos mencionados anteriormente.

El segundo método probado fue el que proporcionó los mejores resultados, dado que rindió exclusivamente la 3,3-etilendioxo -progesterona (31), y consistió en el tratamiento del compuesto 30 con ácido p-toluensulfónico en acetona, a temperatura ambiente por corto tiempo ²³.

En el siguiente paso, el tratamiento del compuesto 31 con bromoacetato de etilo y zinc en benceno, en condiciones de la reacción de Reformatsky, permitió obtener el éster etílico del ácido 3,3-etilendioxo-20(R,S)-hidroxio-23-norcol-5-énico (32) ³⁹, que resultó ser una mezcla de los epímeros 32(20R) y 32(20S), según se determinó a partir del espectro de RMN-¹H de 32.

32(2OR)32(2OS)

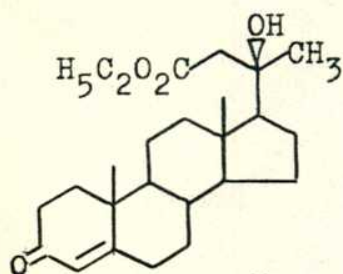
La mezcla 32(2OR+2OS) fue separada por CLAR, en las condiciones indicadas en la Parte Experimental. Se identificó cada epímero mediante el análisis de su espectro de RMN-¹H. El epímero 32(2OR) presentaba un valor de desplazamiento químico de 1,20 ppm para los protones del grupo metilo de C-21, mientras que en el caso del epímero 32(2OS) este valor era de 1,34 ppm. Estos valores son semejantes a los presentados por los epímeros 25(2OR) y 25(2OS), situación predecible ya que, las diferencias entre los compuestos 25 y 32 se encuentran remotas a los hidrógenos en estudio.

Se determinó, además, la proporción de cada epímero en la mezcla 32(2OR+2OS), por integración de las áreas de cada uno de los picos del cromatograma, hallándose que el isómero 32(2OS) es el mayoritario y que representa un 62% de la mezcla.

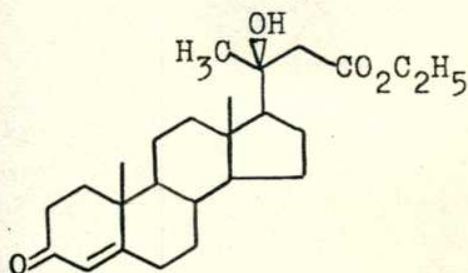
La separación de ambos epímeros se realizó únicamente con el fin de disponer de cada uno de ellos para estudios de RMN-¹³C, tal como se discutirá en el Capítulo 4.

Continuando con la secuencia, se hidrolizó el grupo pro-

teador del carbonilo de C-3 del compuesto 32, por tratamiento con ácido p-toluensulfónico en acetona. Se aisló el éster etílico del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico (33), como mezcla de los epímeros 33(20R) y 33(20S).



33(20R)

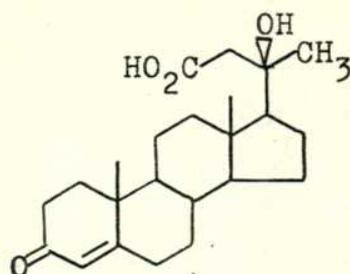
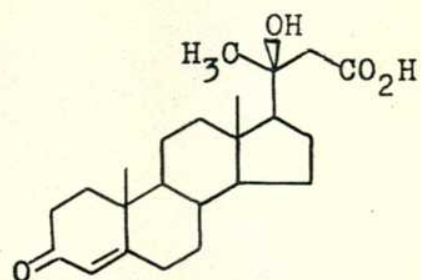


33(20S)

En el espectro de RMN-¹H de la mezcla de ambos epímeros, se observa que los protones de los grupos metilo de C-21 aparecen como dos singuletes a un valor de desplazamiento químico de 1,20 ppm para el isómero 33(20R) y de 1,36 ppm para el 33(20S).

Se intentó separar ambos epímeros por CLAR probando diversas mezclas de metanol:agua, pero en todos los casos se observaba un solo pico en el cromatograma, cuyo tiempo de retención aumentaba al aumentar la proporción de agua en el solvente de elución.

Por último, se hidrolizó el grupo éster etílico del compuesto 33, obteniéndose el ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico (18), también como mezcla epimérica de 18(20R) y 18(20S).

18(20R)18(20S)

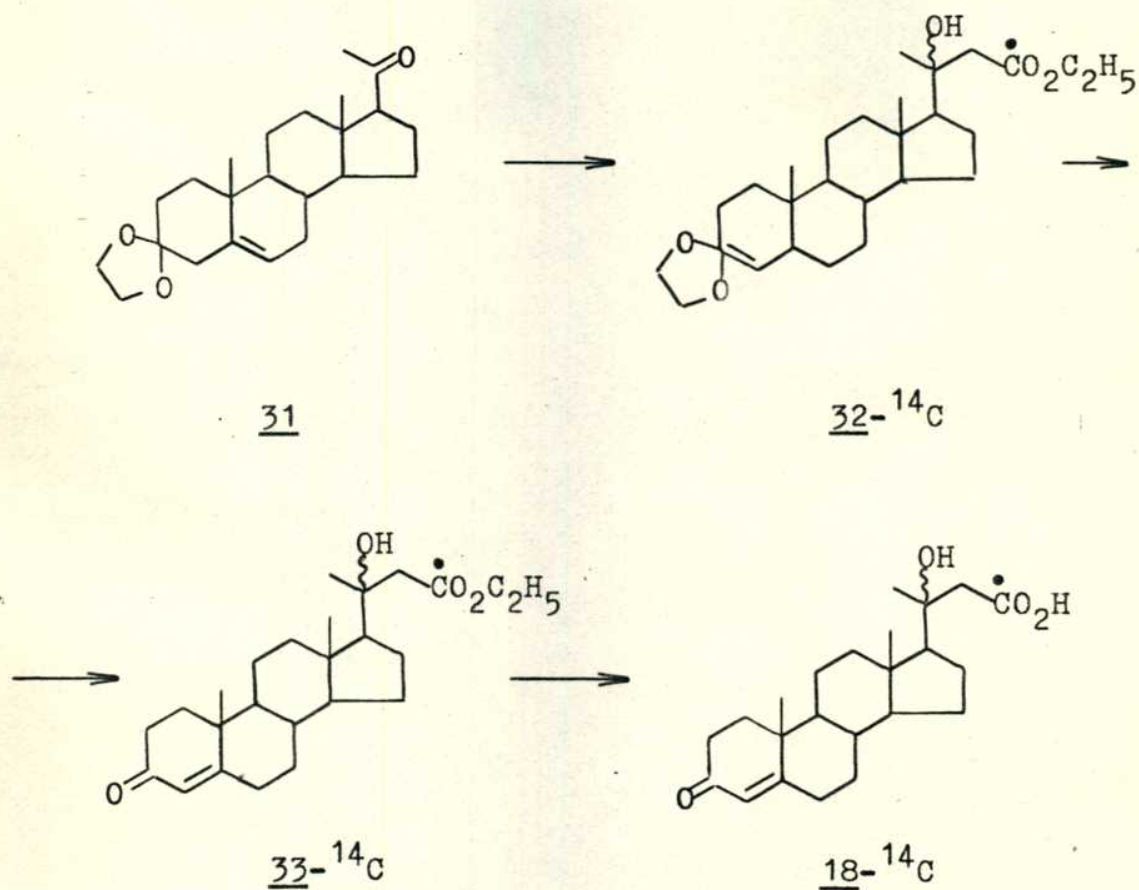
En el espectro de RMN-¹H de la mezcla de ambos epímeros, se identificó cada uno de ellos por el valor del desplazamiento químico de los protones del grupo metilo de C-21, el cual depende de la configuración de C-20. Este valor era de 1,62 ppm en el caso del epímero 18(20R) y de 1,78 ppm en el 18(20S).

3. b.- Síntesis del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico-24-¹⁴C (18-¹⁴C)

Para la obtención del producto marcado, se llevó a cabo la reacción de Reformatsky sobre el compuesto 31, como se indicó anteriormente, pero usando en este caso bromoacetato de etilo-(1-¹⁴C). La reacción permitió obtener el éster etílico del ácido 3,3-etilendioxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24-¹⁴C (32-¹⁴C) con un rendimiento del 70%, el que fue recristalizado de metanol hasta actividad constante.

La hidrólisis del grupo protector del carbonilo de C-3 se efectuó, como antes, por tratamiento con ácido p-toluensul-

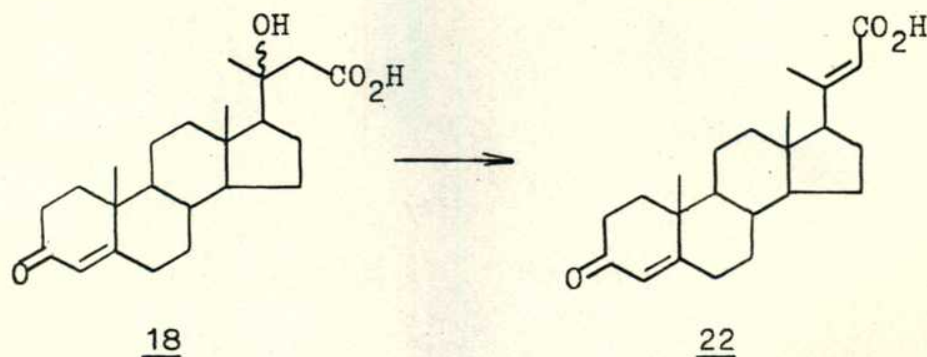
fónico en acetona. Se aisló así, el éster etílico del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico-24- ^{14}C (33- ^{14}C), el que se recrystalizó de etanol hasta actividad constante.



Finalmente, se saponificó el grupo éster, aislándose el ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico-24- ^{14}C (18- ^{14}C), el cual fue recrystalizado de acetona hasta actividad constante.

4. a.- Síntesis del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico (22)

Para la preparación del compuesto 22 aparecía como muy simple proceder a la deshidratación de 18, según:



Sin embargo, al intentar la reacción de deshidratación con el compuesto 18, por catálisis ácida en medio etanólico ⁴⁰, se observó que en lugar de la deshidratación se producía la esterificación del grupo ácido con el etanol, conduciendo al compuesto 33. Por lo tanto, se arribó a la conclusión que el paso debería efectuarse sobre el éster y no directamente sobre el ácido carboxílico; pero, por otro lado, la posibilidad de deshidratar un éster como 33 con oxiclóruo de fósforo en piridina resultaba incompatible con el sistema 3-ceto- Δ^4 , debido a la formación de un enol fosforilado ⁴⁰.

Debido a lo mencionado anteriormente, se proyectó la síntesis del compuesto 22 partiendo del producto de Reformatsky 32, el cual presentaba el sistema 3-ceto- Δ^4 protegido como su cicloetilendioxi derivado (figura 13).

Por reacción del compuesto 32 con oxiclóruo de fósforo en piridina, se obtuvo una mezcla de isómeros, según se determinó mediante el análisis del espectro de RMN-¹H del producto

de reacción.

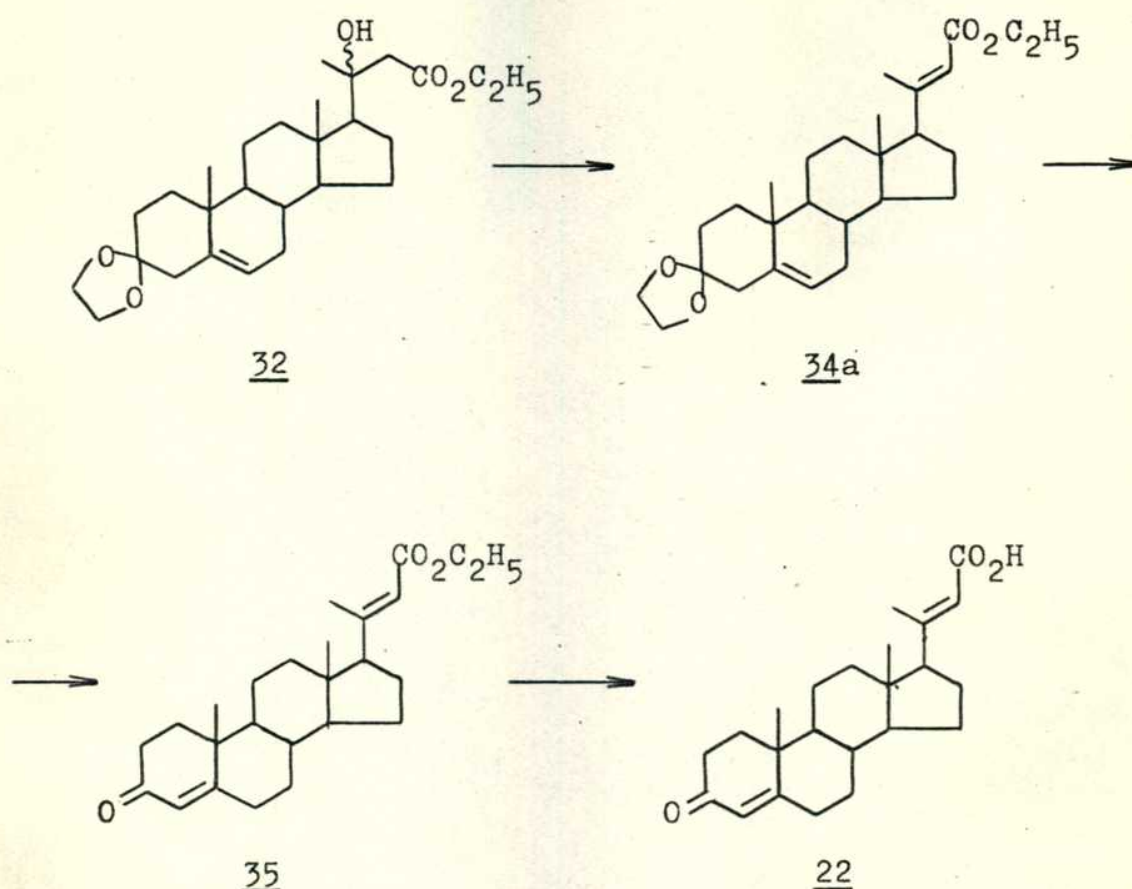
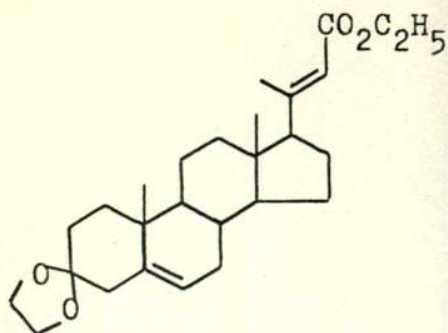
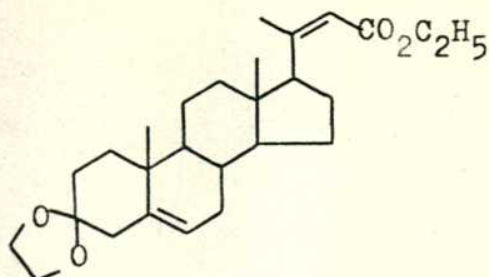
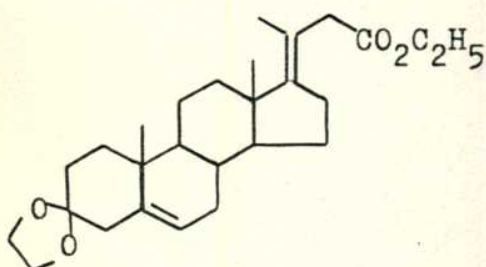
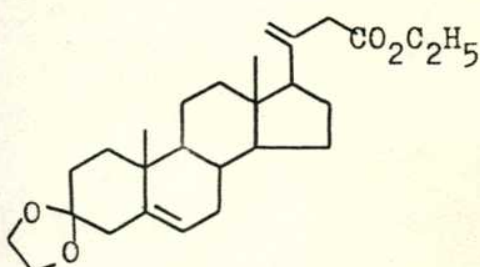


Figura 13: Esquema de síntesis del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico (22).

Los componentes de la mezcla fueron identificados como los ésteres etílicos de los ácidos 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (34a), 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20(22)(Z)-diénico (34b), 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (34c) y 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20-diénico (34d):

34a34b34c34d

Por análisis de las señales de C-21 y C-22 en el espectro de RMN-¹H de la mezcla, se pudieron asignar las señales correspondientes a los cuatro isómeros. En el caso del compuesto 34c, la señal de los protones de C-21 aparece como un triplete a 1,78 ppm, mientras que el compuesto 34d presenta un doblete a 5,00 ppm correspondiente a los protones vinílicos de C-21. Los isómeros 34a y 34b presentan un multiplete a 5,70 ppm y 5,78 ppm, respectivamente, que corresponde al protón vinílico de C-22.

Utilizando el valor del desplazamiento químico de los protones del grupo metilo de C-21 fue posible establecer la esteoquímica del doble enlace en posición 20(22) ³⁵. En el caso

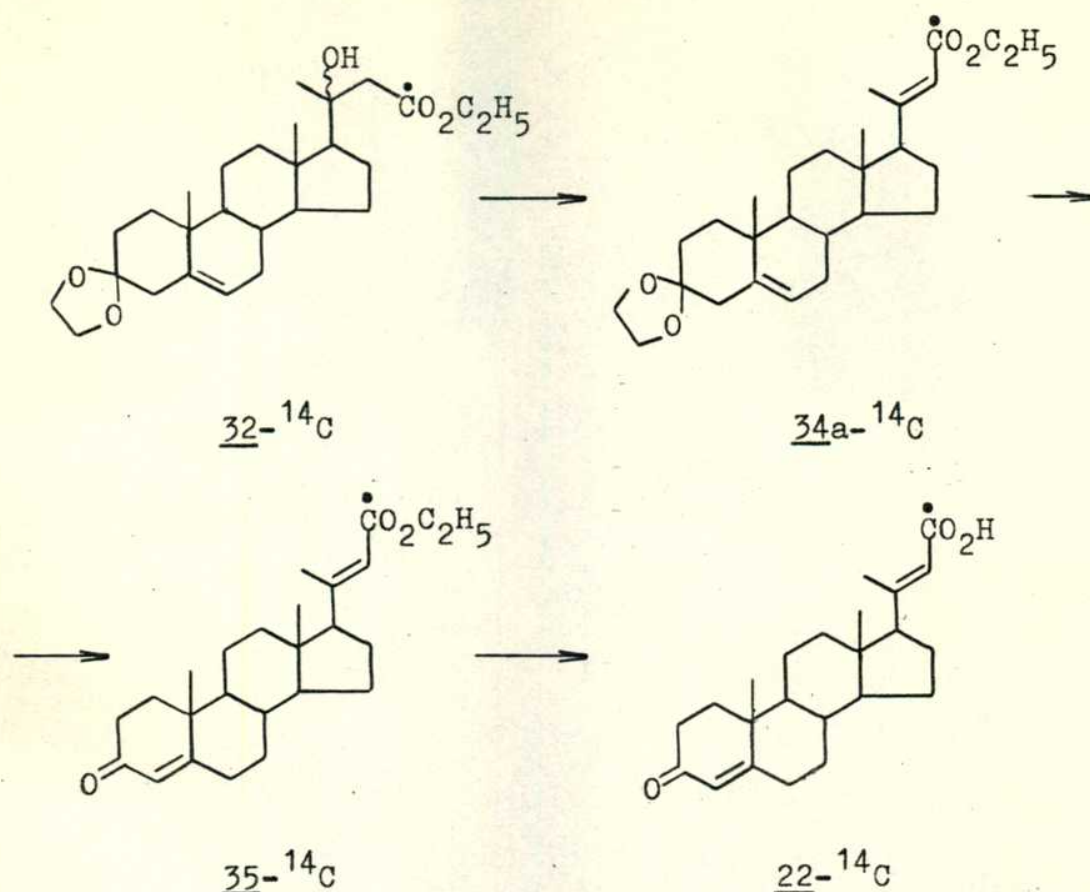
del isómero E (34a) este valor es de 2,20 ppm, mientras que para el isómero Z (34b) es de 1,90 ppm.

Por recristalización de la mezcla se separó un isómero puro, el que fue identificado como el isómero E (34a) por espectroscopía de RMN-¹H.

La mezcla de productos contenida en las aguas madres de la recristalización fue separada por CLAR, en las condiciones descriptas en la Parte Experimental. El cromatograma mostraba cuatro picos, los cuales fueron identificados como los isómeros ya indicados, mediante el análisis del espectro de RMN-¹H de cada uno de ellos. Además, se determinó la proporción de cada isómero en la mezcla por integración de las áreas de cada uno de los picos del cromatograma, obteniéndose como resultado la siguiente composición: isómero E (34a), 41%; isómero Z (34b), 14%; isómero $\Delta^{17(20)}$ (34c), 22% e isómero Δ^{20} (34d), 23%.

La hidrólisis del grupo protector de C-3 del isómero E (34a) se llevó a cabo por tratamiento con ácido p-toluensulfónico en acetona. Se obtuvo el éster etílico del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico (35), el que fue saponificado, aislándose el ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico (22).

4. b.- Síntesis del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico-24-¹⁴C (22-¹⁴C)

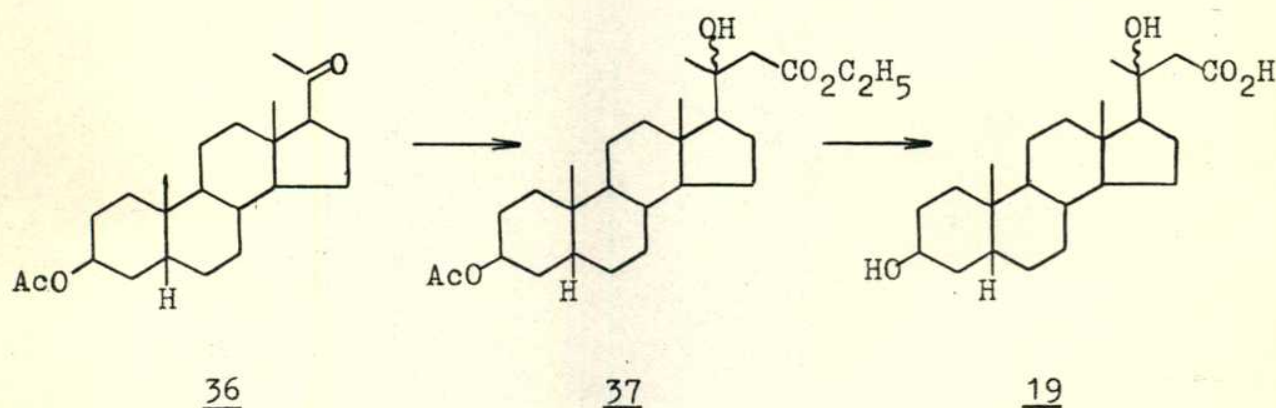


El éster etílico del ácido 3,3-etilendioxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C ($\text{32-}^{14}\text{C}$) se hizo reaccionar con oxicloriguro de fósforo en piridina anhidra. La mezcla de reacción fue purificada por cromatografía en columna de alúmina y separada por CLAR, aislándose el isómero E ($\text{34a-}^{14}\text{C}$), con un rendimiento del 45%. Se recrystalizó de etanol hasta actividad constante. La hidrólisis del grupo protector de C-3 por tratamiento con ácido p-toluensulfónico en acetona produjo el compuesto $\text{35-}^{14}\text{C}$, con un rendimiento del 92%, el que fue recrystalizado de etanol hasta actividad constante.

Finalmente, se hidrolizó el grupo éster del compuesto $\text{35-}^{14}\text{C}$, aislándose el ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-

-diénico-24- ^{14}C ($22\text{-}^{14}\text{C}$), el que se recrystalizó de acetona hasta actividad constante.

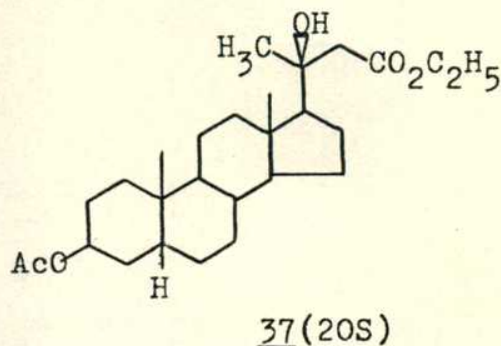
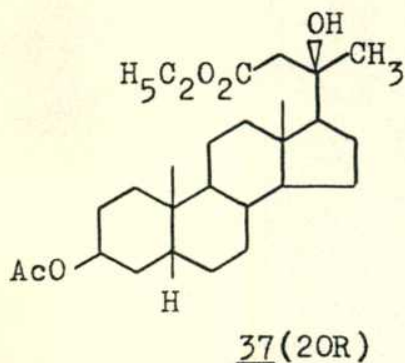
5. a.- Síntesis del ácido $3\beta,20(\text{R},\text{S})$ -dihidroxi-23-nor- 5β -colánico (19)



El primer paso para la preparación del producto buscado consistió en la reacción de 3β -acetoxi- 5β -pregnan-20-ona (36) con bromoacetato de etilo y zinc, en benceno, y posterior acetilación del producto de reacción, obteniéndose así el éster etílico del ácido 3β -acetoxi- $20(\text{R},\text{S})$ -hidroxi-23-nor- 5β -colánico (37), como una mezcla de los epímeros 37(20R) y 37(20S).

Tal como se comentó anteriormente para la síntesis de los ácidos $3\beta,20(\text{R},\text{S})$ -dihidroxi-23-norcol-5-énico (17) y 3-ceto- $20(\text{R},\text{S})$ -hidroxi-23-norcol-4-énico (18), la presencia de ambos epímeros se determinó por espectroscopía de RMN- ^1H , observando el valor del desplazamiento químico de los protones

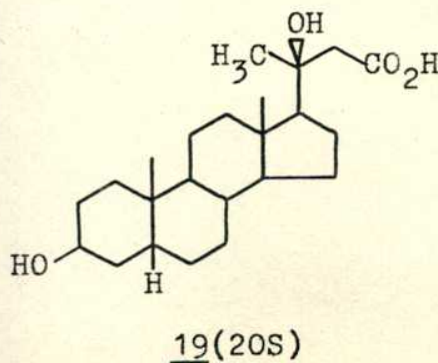
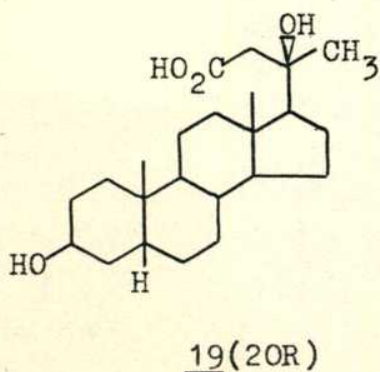
de C-21.



En el epímero 37(2OR) este valor era de 1,24 ppm, mientras que en el 37(2OS) era de 1,36 ppm.

La mezcla de ambos epímeros fue separada por CLAR, tal como se indica en la Parte Experimental, identificándose cada epímero a partir de su espectro de RMN-¹H. Del cromatograma obtenido por CLAR se determinó la proporción en que se encuentra cada epímero en la mezcla, siendo el 2OS el mayoritario (62%).

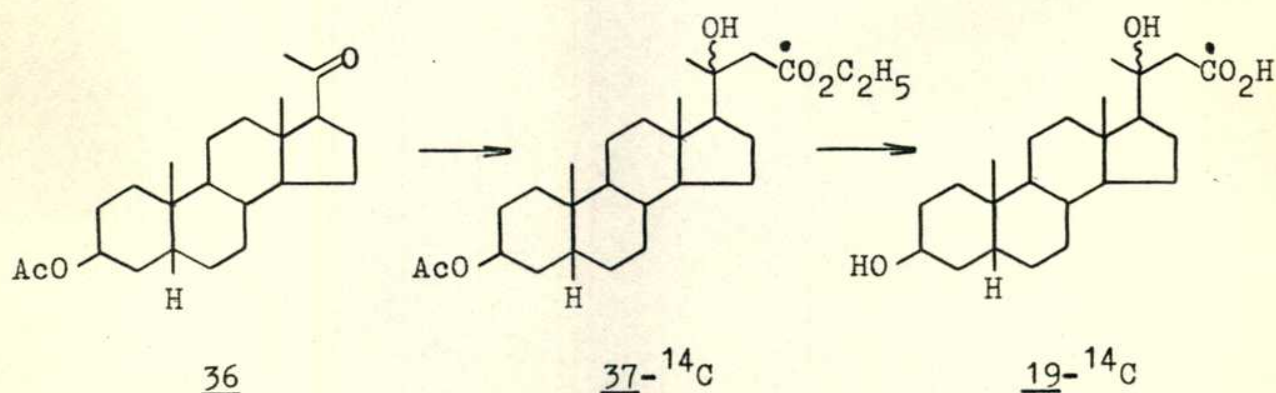
La mezcla 37(2OR+2OS) fue hidrolizada, obteniéndose el ácido 3β,20(R,S)-dihidroxi-23-nor-5β-colánico (19), como mezcla epimérica. En el espectro de RMN-¹H de la misma, se obser-



varon las señales de los grupos metilo de C-21 de cada uno de los epímeros. En el epímero 19(2OR) esta señal aparece a un valor de desplazamiento químico de 1,56 ppm, mientras que el valor es de 1,72 ppm para el epímero 19(2OS).

Las síntesis de los compuestos 37 y 19 no están descriptas en literatura. La secuencia de síntesis utilizada: reacción de Reformatsky y posterior hidrólisis alcalina resultó ser un buen método, como lo indican los rendimientos obtenidos, 84% en el primer paso y 87% en el segundo.

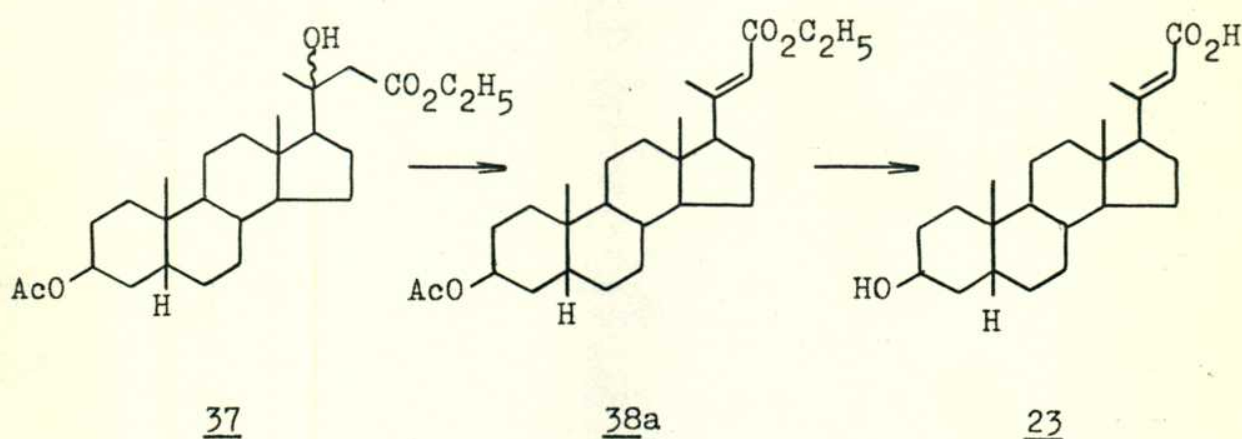
5. b.- Síntesis del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-nor-5 β -colánico-24- ^{14}C (19- ^{14}C)



Para la preparación del producto radiactivo indicado, se hizo reaccionar 3 β -acetoxi-5 β -pregnan-20-ona (36) con bromoacetato de etilo-(1- ^{14}C) y zinc, en benceno anhidro, en las condiciones antes descriptas. Luego de la acetilación del producto de reacción se obtuvo el éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-

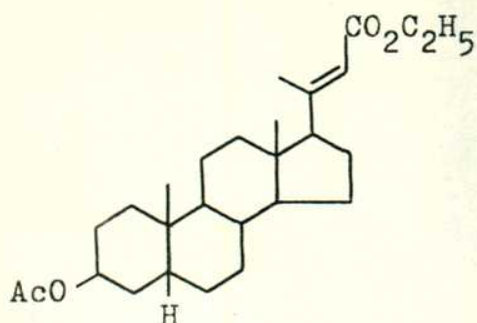
-20(R,S)-hidroxi-23-nor-5 β -colánico-24- ^{14}C (37- ^{14}C), con un rendimiento del 85% y se lo recrystalizó hasta actividad constante. A continuación, se realizó el proceso de hidrólisis, aislándose el ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-nor-5 β -colánico-24- ^{14}C (19- ^{14}C), con un rendimiento del 84%. El producto de reacción se recrystalizó de acetona hasta actividad constante.

6. a.- Síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-
-énico (23)

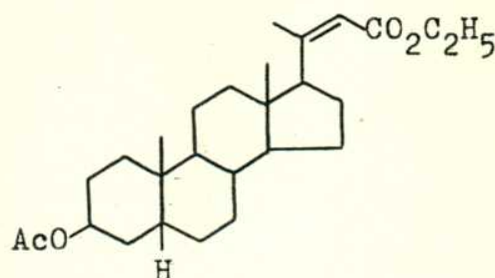


Por reacción del compuesto 37 con oxiclورو de fósforo en piridina, se obtuvo una mezcla de isómeros, según se determinó mediante el análisis del espectro de RMN- ^1H de la mezcla de reacción. Los componentes de la misma fueron identificados como los ésteres etílicos de los ácidos 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-énico (38a), 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-20(22)(Z)-énico (38b), 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-17(20)-éni-

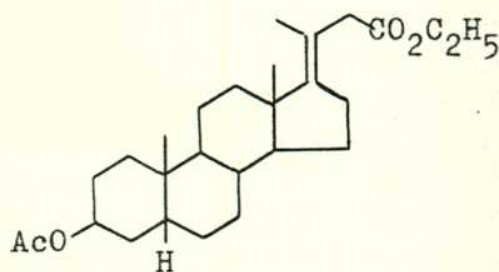
co (38c) y 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-20-énico (38d):



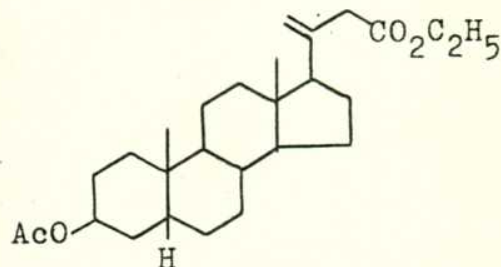
38a



38b



38c



38d

En base al análisis de las señales correspondientes a los protones de C-21 y C-22, se asignaron las señales pertenecientes a los cuatro isómeros en el espectro de RMN-¹H de la mezcla. En el caso del isómero 38c, la señal de los protones de C-21 aparece como un triplete a un valor de desplazamiento químico de 1,74 ppm. Por otro lado, el isómero 38d presenta un doblete a 4,94 ppm, correspondiente a los dos protones vinílicos de C-21.

Tal como se explicó anteriormente, en este caso también fue posible utilizar el valor del desplazamiento químico de los

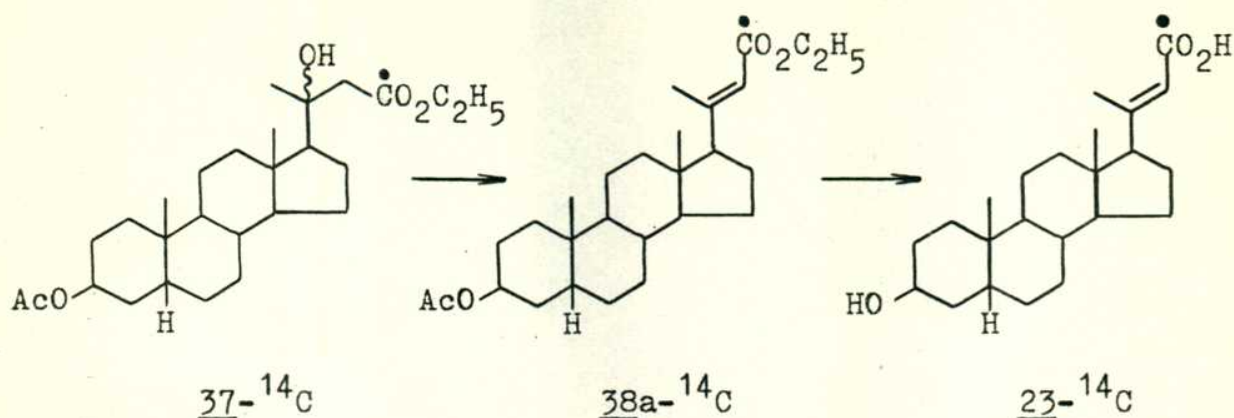
protones del grupo metilo de C-21 para establecer la estereoquímica del doble enlace en posición 20(22). En el caso del isómero E (38a) este valor es de 1,26 ppm, mientras que para el isómero Z (38b) es de 1,90 ppm.

Por recristalización de la mezcla se separó un compuesto puro, el cual fue identificado como el isómero 38a, mediante el análisis de su espectro de RMN-¹H.

La mezcla correspondiente a las aguas madres de la recristalización fue separada por CLAR, en las condiciones descritas en la Parte Experimental. El cromatograma presentaba cuatro picos, los cuales fueron colectados, y los respectivos productos fueron identificados como los cuatro isómeros (38a, 38b, 38c y 38d) mediante el análisis del espectro de RMN-¹H de cada uno de ellos. Además, se determinó la proporción de cada isómero en la mezcla por integración de las áreas de cada uno de los picos del cromatograma: isómero E (38a), 50%; isómero Z (38b), 14%; isómero $\Delta^{17(20)}$ (38c), 15% e isómero Δ^{20} (38d), 21%.

Por hidrólisis del isómero E (38a) se obtuvo, con buen rendimiento, el ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-énico (23), caracterizado por sus propiedades espectroscópicas.

6. b.- Síntesis del ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-énico-24-¹⁴C (23-¹⁴C)

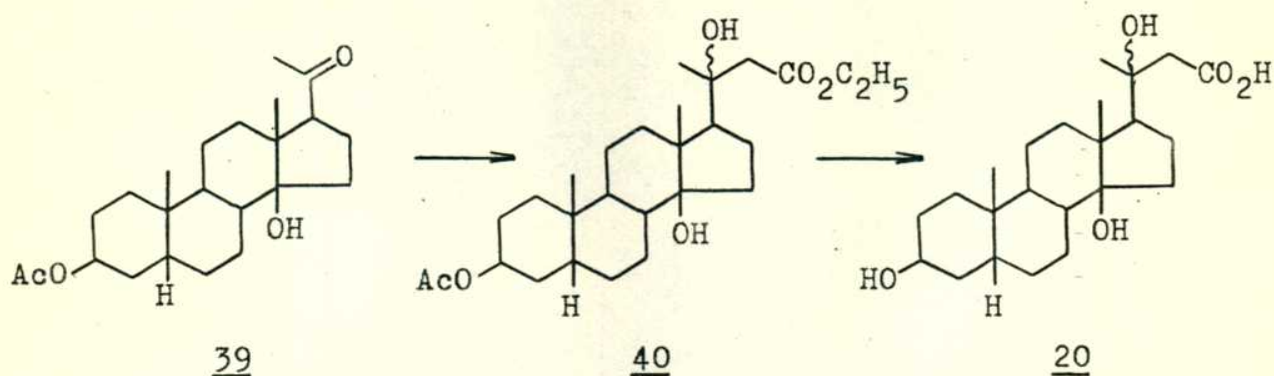


El producto radiactivo $\text{23-}^{14}\text{C}$ se obtuvo por la secuencia de pasos presentada para la preparación del compuesto 23. Esta se inició con la reacción del compuesto $\text{37-}^{14}\text{C}$ con oxiclórico de fósforo en piridina anhidra. La mezcla producto de la reacción fue purificada por cromatografía en columna de alúmina y separada en sus componentes por CLAR, aislándose el éster etílico del ácido 3β -acetoxi-23-nor- 5β -col-20(22)(E)-énico-24- ^{14}C ($\text{38-}^{14}\text{C}$), con un rendimiento del 44%. Se recrystalizó hasta actividad constante y a continuación, se lo hidrolizó en las condiciones ya descritas, aislándose el ácido 3β -hidroxi-23-nor- 5β -col-20(22)(E)-énico-24- ^{14}C ($\text{23-}^{14}\text{C}$), con un rendimiento del 86%, el que se recrystalizó de etanol hasta actividad constante.

7. a.- Síntesis del ácido $3\beta, 14\beta, 20(\text{R}, \text{S})$ -trihidroxi-23-nor- 5β -colánico (20)

Para la síntesis del compuesto 20 se pensó en acceder a un

20-ceto-pregnano que presentara la funcionalización adecuada en la estructura tetracíclica esteroideal.

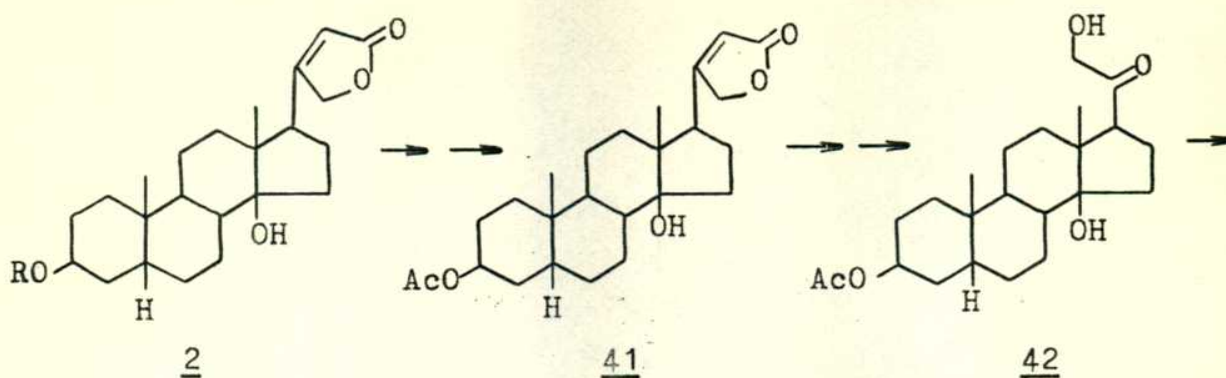


Por un lado, la configuración 5β debía estar presente en el compuesto de partida y por otra parte, el grupo hidroxilo en posición 14β era otro factor condicionante.

Existía la posibilidad de hidroxilación de un doble enlace en posición 14(15), reacción para la que se encuentran descritas varias técnicas en literatura ^{41, 42}. Se probó una de ellas ⁴² utilizando como compuesto modelo la Δ^{14} -digitoxigenina, la cual se hizo reaccionar con N-iodosuccinimida en acetona:agua y posteriormente con Níquel Raney en cloruro de metileno, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por lo tanto, resultaba prácticamente imprescindible que el 20-ceto-pregnano de partida tuviera un grupo hidroxilo en el C-14 con la configuración requerida.

En base a todo ello, se pensó que el 20-ceto-pregnano que cumplía dichos requisitos era el compuesto 39.

Su preparación había sido descripta en literatura ^{43, 44}, tal como se indica en la figura 14.



R: digitoxosa

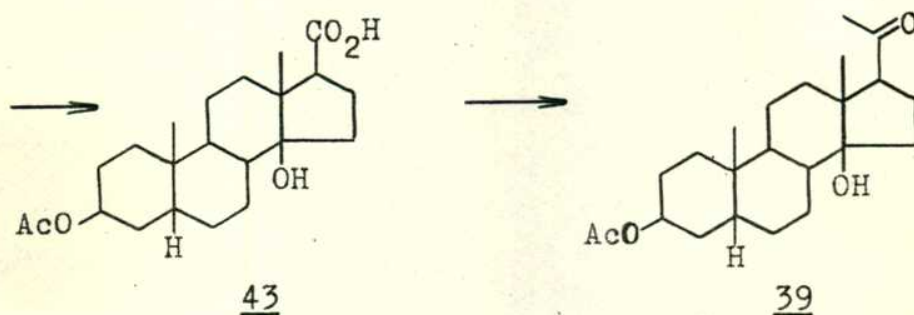
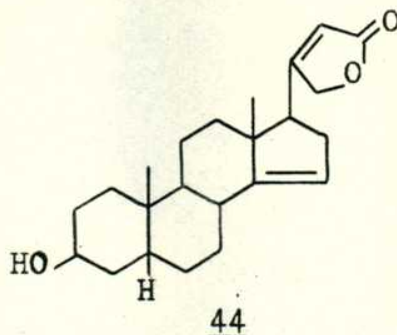


Figura 14: Esquema de síntesis del compuesto 39.

La degradación del anillo butenólido de la digitoxina (2) permitiría obtener el ácido etiánico (43) correspondiente, el cual por reacción con metil-litio, en éter etílico, daría el compuesto 39. Por lo tanto, se siguió ese camino introduciendo modificaciones, tal como se discute a continuación:

El tratamiento de digitoxina (2) en metanol a reflujo, con ácido sulfúrico 0,1N durante 1 hora, dio lugar a la formación de dos componentes en distinta proporción, según se determinó por CCD (sistema 1). Dichos componentes fueron separados por cromatografía en columna de sílica gel, utilizando mezclas de tolueno y cloruro de metileno como solvente de

elución. Los productos de reacción fueron identificados como digitoxigenina (1) y Δ^{14} -digitoxigenina (44) mediante espec-



troscopía de RMN- ^1H , siendo la digitoxigenina el componente mayoritario. A medida que disminuía el tiempo de reacción, disminuía también la proporción de producto deshidratado en la mezcla. Se encontró que 40 minutos era el tiempo de hidrólisis óptimo, ya que, prácticamente no quedaba digitoxina (2) sin hidrolizar, y apenas comenzaba a formarse el producto deshidratado 44. La digitoxina (2) fue acetilada con una mezcla de anhídrido acético y piridina, y el acetato de digitoxigenina (41) fue sometido a la degradación de su anillo butenólido mediante ozonólisis.

En los primeros ensayos se utilizó acetato de etilo como solvente en la reacción de ozonólisis, pero el producto de reacción resultaba muy impuro y el rendimiento era bajo. Cuando se utiliza como solvente en la reacción de ozonólisis, el acetato de etilo puede dar lugar a reacciones laterales, a menos que se utilice a temperaturas muy bajas (-80°C) y que haya sido muy bien purificado ⁴⁵. A pesar de controlar la tempera-

tura y de haberlo purificado exhaustivamente, en las distintas pruebas de ozonólisis en que se usó acetato de etilo, siempre se obtenía el mismo resultado. Se decidió, entonces, llevar a cabo la reacción de ozonólisis en cloruro de metileno, el cual es un solvente de fácil purificación y que no necesita un control tan estricto de la temperatura.

Se disolvió la 3β -acetil-digitoxigenina (41) en cloruro de metileno, se enfrió a -60°C y en la solución se hizo burbujear una corriente de ozono. La reacción se controló por CCD (sistema 5), comprobándose que a los 20 minutos de reacción ya no quedaba producto de partida. La destrucción del ozónido, en condiciones reductoras, tal como se explica en la Parte Experimental, rindió 3β -acetoxi- 14β , 21 -dihidroxi- 5β -pregnanolona (42), con un rendimiento del 77% respecto de 3β -acetil-digitoxigenina (41).

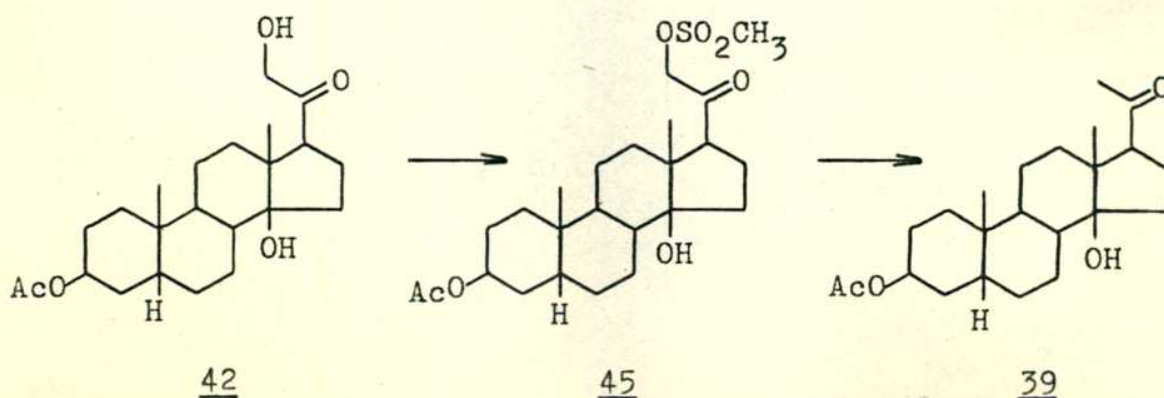
A fin de obtener el ácido etiánico (43), se procedió a degradar la cadena lateral tratando el compuesto 42 en metanol, con una solución acuosa de ácido peryódico ⁴³ durante 2 horas a temperatura ambiente. Se obtuvo el ácido etiánico 43, el cual fue caracterizado por espectroscopía de RMN-¹H y RMN-¹³C.

Para llegar al compuesto 39 restaba construir la cadena de 20-ceto-pregnano. Para ello, de acuerdo a la técnica descrita ⁴⁴, se hizo reaccionar el ácido etiánico (43) con una solución de metil-litio al 3% en éter etílico, a 0°C . El producto de reacción obtenido presentaba varias manchas por CCD (sistema 6), una de las cuales correspondía al producto de partida. En vista de que el compuesto 43 presentaba otras po-

siciones reactivas frente al metil-litio, más allá de proteger el hidroxilo en posición 14β , lo cual suele presentar inconvenientes, se pensó en aplicar otro procedimiento para la parte final de la construcción de la cadena lateral.

Se consideró la posibilidad de obviar la degradación hasta el ácido etiánico mediante la transformación directa del compuesto 42 en el compuesto 39. Para ello, la idea consistía en proteger el grupo hidroxilo de C-21 del compuesto 42 con un grupo protector que actuara como buen grupo saliente, para luego proceder a su desplazamiento. Uno de los métodos consistía en acetilar el grupo hidroxilo de C-21 y luego eliminar el grupo 21-acetoxi con ácido iodhídrico, tal como se encuentra descrito para la 21-acetoxi-pregnenolona ⁴⁶. Las condiciones de reacción que debían ser usadas, es decir, calentamiento a 100°C con ácido iodhídrico 47%, podrían provocar la deshidratación del hidroxilo 14β , inconveniente que hizo necesaria la búsqueda de otro grupo protector que pudiera ser desplazado en condiciones no excesivamente drásticas.

Otra posibilidad sería la introducción de un grupo mesilo en C-21 ⁴⁷ y la posterior eliminación de la función oxigenada de C-21 ⁴⁸, según se presenta a continuación:



El tratamiento del compuesto 42 con cloruro de mesilo, en las condiciones descriptas en la Parte Experimental, rindió la 3β -acetoxi- 14β -hidroxi-21-metansulfoniloxi- 5β -pregnan-20-ona (45). Inicialmente se buscaron las mejores condiciones de reacción, variando el tiempo de la misma y controlándola por CCD (sistema 6). Se encontró que 15 minutos era el tiempo de reacción óptimo, ya que se obtenía un producto poco impurificado y con un buen rendimiento (80%). Cuando el tiempo de reacción era mayor, el compuesto 45 se obtenía con muy bajo rendimiento y acompañado por otros productos, que no fueron analizados.

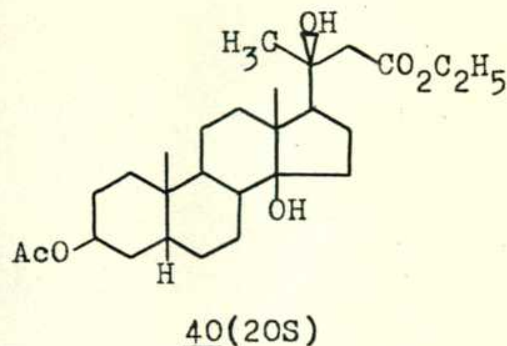
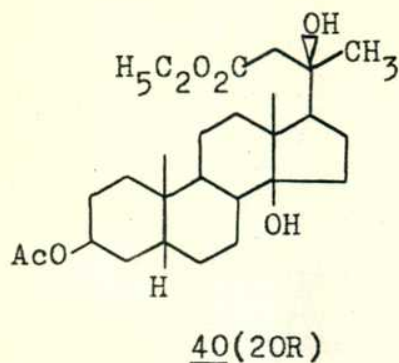
El tratamiento del compuesto 45 con ioduro de sodio en ácido acético glacial, a temperatura ambiente, produjo el producto 39. Las condiciones de reacción utilizadas eran lo suficientemente suaves como para permitir la obtención del 20-ceto-pregnano 39, sin presentarse el problema de la deshidratación del grupo hidroxilo ubicado en posición 14 con orientación β .

La reacción del compuesto 39 con bromoacetato de etilo y zinc, en benceno anhidro, en condiciones de Reformatsky, produjo el éster etílico del ácido 3β -acetoxi- 14β ,20(R,S)-dihidroxi-23-nor- 5β -colánico (40), como mezcla de los epímeros 40(2OR) y 40(2OS).

Ambos epímeros fueron identificados observando el desplazamiento químico de los protones del grupo metilo de C-21, en el espectro de RMN- ^1H del producto de reacción.

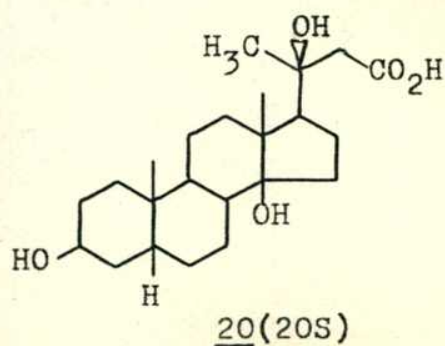
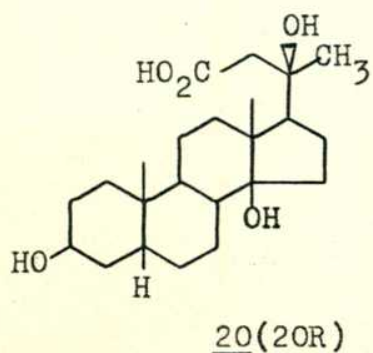
En el caso del epímero 40(2OR) este valor era de 1,27

ppm, mientras que para el 40(20S) era de 1,43 ppm.



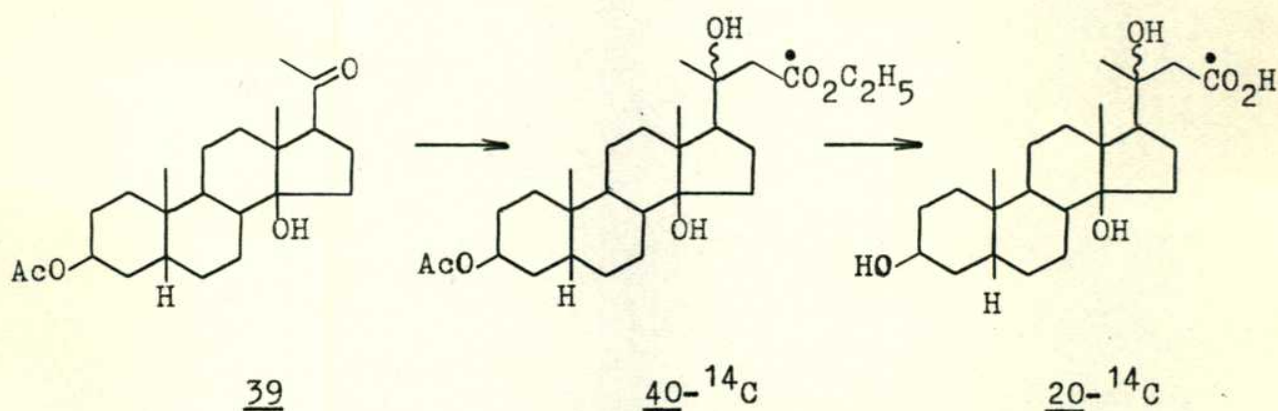
Además del producto de reacción se recuperó un 34% del producto de partida. Se probó mejorar el rendimiento aumentando el tiempo de reacción, pero se obtuvo el mismo resultado. Otra prueba que se hizo fue aumentar la proporción de bromoacetato de etilo y zinc con respecto a la del 20-ceto-pregnano (39), en este caso el rendimiento fue menor y se obtuvo un producto más impurificado.

El compuesto 40 fue hidrolizado en las condiciones descritas en la Parte Experimental, aislándose el ácido 3 β ,14 β , 20(R,S)-trihidroxi-23-nor-5 β -colánico (20), como mezcla de los epímeros 20(20R) y 20(20S).



A partir de las señales de los grupos metilo de C-21 en el espectro de RMN- ^1H del producto de reacción, se identificó cada uno de los epímeros. En el epímero 20(20R) esta señal aparece a 1,42 ppm, mientras que en el 20(20S) el valor de desplazamiento químico de la misma es de 1,80 ppm.

7. b.- Síntesis del ácido $3\beta,14\beta,20(\text{R,S})$ -trihidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C (20- ^{14}C)



Para la obtención del producto radiactivo indicado, se hizo reaccionar el compuesto 39 con bromoacetato de etilo- $-(1-^{14}\text{C})$ y zinc, en benceno, en las condiciones antes descritas. Luego de la acetilación del producto de reacción se obtuvo el éster etílico del ácido 3β -acetoxi- $14\beta,20(\text{R,S})$ -dihidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C (40- ^{14}C), el que se recristalizó hasta actividad constante. Luego se lo hidrolizó, aislándose el ácido $3\beta,14\beta,20(\text{R,S})$ -trihidroxi-23-nor- 5β -coláni-

co-24-¹⁴C (20-¹⁴C), con un rendimiento del 71%.

El producto de reacción fue recrystalizado de acetona hasta actividad constante.

B. Ensayos tendientes a obtener la sal de sodio del ácido 3 β ,
20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico

Dados los resultados de incorporación positiva de precursores solubles en agua en glicósidos cardenólidos, en plantas del género Digitalis ¹⁴, ¹⁵, ¹⁶, ⁴⁹, y teniendo en cuenta que los compuestos que se deseaban probar (ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos y ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos) eran todos insolubles, se consideró la posibilidad de preparar derivados de los mismos que les confirieran solubilidad en agua y favorecieran su absorción por el tejido vegetal.

Por otra parte, como en los primeros ensayos de administración del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico-24-¹⁴C (17-¹⁴C) a plantas enteras de Digitalis purpurea la actividad absorbida por las hojas era inferior al 30%, se pensó que la absorción probablemente aumentaría si en lugar del ácido libre se lo administraba como su sal de sodio.

Para ello, se probó si el compuesto 17 se solubilizaba en soluciones alcalinas, por formación de su sal. Los ensayos realizados con soluciones acuosas de hidróxido de sodio 10% y 20% y con solución saturada de bicarbonato de sodio en agua, no dieron resultados positivos.

Posteriormente, se intentó hacer reaccionar el ácido 17 con una cantidad equimolecular de hidruro de sodio en tetrahidrofurano anhidro, a temperatura ambiente y calentando a reflujo durante varias horas. La reacción se controló por CCD (sistema 5) y en ambos casos se recuperó el ácido libre.

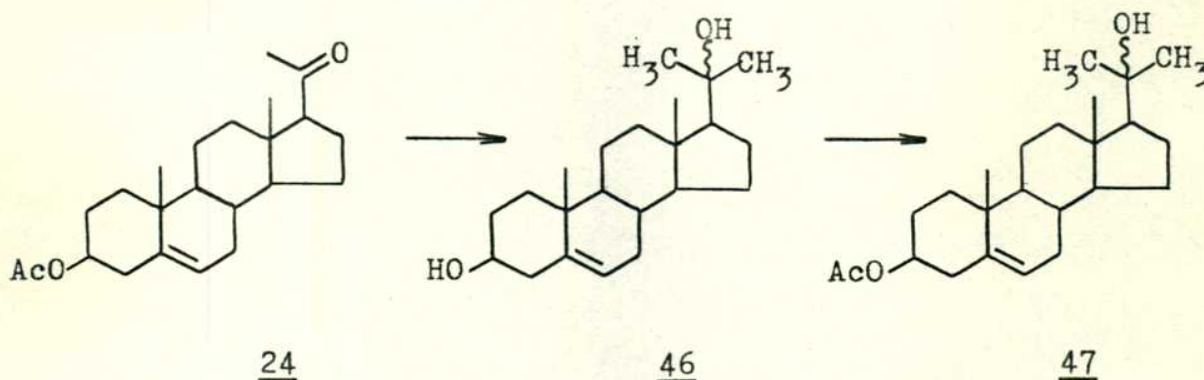
Idéntico resultado se obtuvo al tratar el ácido 17 con metóxido de sodio en metanol y por tratamiento del mismo compuesto, disuelto en metanol, con una solución acuosa de hidróxido de sodio 50%, calentando a reflujo.

En vista de los fracasados intentos para preparar la sal de sodio del ácido 17, es probable que se trate de un ácido débil o que exista algún impedimento de tipo estérico para la formación de la sal. Por lo tanto, se administró como tal, al igual que el resto de los ácidos sintetizados, en los ensayos realizados con plantas Digitalis purpurea.

C. Síntesis de 3 β ,20-dihidroxi-20-metil-pregn-5-eno (46) y 3 β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno (47)

Los compuestos 46 y 47 fueron sintetizados con el objeto de disponer de compuestos modelos para efectuar correlaciones con los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos y sus correspondientes ésteres etílicos en estudios de RMN- ^{13}C , tal como se describirá en el Capítulo 4.

Para la obtención del compuesto 47, se hizo reaccionar acetato de pregnenolona (24) con ioduro de metilmagnesio en éter etílico anhidro, en las condiciones de la reacción de Grignard ⁵⁰.



Se obtuvo un sólido difícil de purificar por recristalización, el que fue acetilado con una mezcla de anhídrido acético y piridina y cromatografiado en una columna de sílica H, utilizando éter de petróleo como solvente de elución. Se aisló un producto de reacción con un rendimiento del 10% y cuyos espectros infrarrojo y de RMN- ^{13}C indicaban la presencia de dos enlaces olefínicos, uno en posición 5(6) y el otro proveniente

de la deshidratación del alcohol terciario de C-20 ⁵¹. En base a este resultado se proyectó, entonces, la síntesis del compuesto 46 a partir de acetato de pregnenolona (24) y metil-litio, en tetrahidrofurano anhidro. Previamente, se preparó el metil-litio por reacción de ioduro de metilo con butil-litio. A la solución de metil-litio en tetrahidrofurano se le agregó la solución de acetato de pregnenolona (24) en el mismo solvente, y luego de un calentamiento a reflujo se aisló el compuesto 46, con un rendimiento del 83%.

Por acetilación de 46, se obtuvo 3 β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno (47) con un rendimiento del 89%.

D. Ensayos preliminares para el aislamiento de glicósidos cardenólidos

1. Extracción de glicósidos cardenólidos de plantas *Digitalis purpurea*

Con el propósito de encontrar el mejor método de extracción de glicósidos cardenólidos de plantas *Digitalis purpurea*, se llevaron a cabo numerosas pruebas tendientes a lograr ese objetivo.

Las primeras pruebas se hicieron con plantas de 14 meses de desarrollo, ensayándose los métodos descritos por Gisvold y Reichstein ¹⁶. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en ambos casos pero dichos métodos implicaban la purificación del extracto en varias etapas y mediante el empleo de variados solventes, lográndose los mejores resultados cuando se disponía de una gran cantidad de material vegetal.

Evans y Cowley ^{1, 2} determinaron las concentraciones de cardenólidos en plantas *Digitalis purpurea* durante el primero y segundo año de desarrollo de las mismas. Encontraron que durante los primeros 7 meses se produce un aumento considerable de la concentración de cardenólidos, ya que éste es un período de rápido crecimiento de la planta (figura 15). Las hojas más activas en su crecimiento son las que más acumulan cardenólidos. En el segundo año de desarrollo, los cardenólidos se distribuyen en toda la planta incluyendo sus flores y sus frutos, los que presentan las mayores concentraciones.

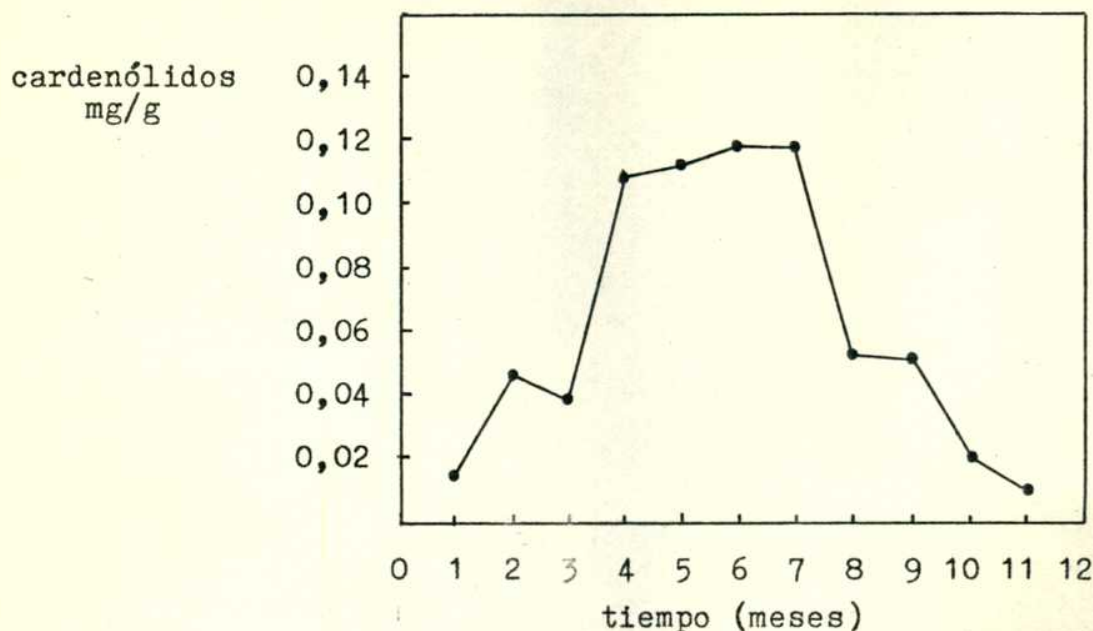


Figura 15: Variación en los niveles de cardenólidos en hojas durante el primer año de crecimiento de plantas Digitalis purpurea.

En base a estos datos resultaba más conveniente trabajar con plantas más pequeñas, entre 4 y 6 meses de desarrollo, con lo cual se reducían las cantidades de material vegetal a extraer. Por este motivo, se buscó un método de extracción más sencillo.

Se probó modificar la técnica de Reichstein¹⁶ eliminando algunas etapas de la purificación, lo cual dio muy buen resultado, ya que el extracto obtenido presentaba por CCD (sistema 2) el mismo grado de purificación que el procesado según la técnica original.

En la literatura se encontró el método de Wegner⁵³, el

que utilizaba agua como solvente de extracción, lo que presentaba la ventaja de no extraer los componentes menos polares de la planta.

Para probar esta última técnica, se trituraron dos plantas de 5 meses de desarrollo con agua en una licuadora chica. A continuación, se pasó el contenido a un erlenmeyer y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente, sonicando esporádicamente, ya que se había observado que la solubilidad de la digitoxina en agua (1g/100l) aumentaba con la sonicación. Se filtró el extracto acuoso y luego de tratarlo con solución de acetato de plomo y de fosfato disódico 10% en agua, se centrifugó y se extrajo varias veces con cloruro de metileno. Por CCD (sistema 2) se observó que, efectivamente, se obtenía un extracto con mayor grado de purificación, pero las manchas que revelaban en la zona de cardenólidos no coincidían en color ni en R_f con las de los testigos de digitoxina, gitoxina y digoxina. Dado este resultado no esperado, se desechó el método de extracción con agua.

La mayoría de los métodos registrados en la literatura utilizaban alcohol (etanol o metanol) o mezclas de alcohol y agua como solvente de extracción, ya que en estos solventes eran solubles los tres glicósidos.

El método de Wichtl ⁵⁴ utilizaba etanol 70% a reflujo y una posterior purificación del extracto con solución de acetato de plomo y fosfato disódico 10% en agua para eliminar ciertos flavonoides amarillos y pigmentos relacionados, extrayendo la fracción de cardenólidos con cloroformo:isopro-

panol (3:2). Se probó este método con plantas de 3 meses, obteniendo un buen rendimiento en cardenólidos.

De todos los métodos probados, éste era el más sencillo y el que había proporcionado los mejores resultados. Sin embargo, según Tittel et al.⁵⁵ no era conveniente clarificar un extracto con solución acuosa de acetato de plomo, en el caso de determinaciones cuantitativas, ya que podían producirse pérdidas de glicósidos en la precipitación.

Es por ello que, basándonos en el método de Wichtl⁵⁴ con algunas modificaciones, se procedió a extraer los glicósidos cardenólidos según la siguiente técnica: la planta entera, sin secar, se molió en un mortero con ayuda de arena lavada. A continuación, se extrajo 5 veces con etanol 70% a reflujo. Los extractos alcohólico-acuosos se concentraron para eliminar el etanol y la fase acuosa se extrajo 5 veces con cloruro de metileno.

2. Purificación del extracto de glicósidos cardenólidos

En las técnicas de Gisvold⁵² y Reichstein¹⁶ la fracción de glicósidos cardenólidos aislada de la planta se hidroliza en medio ácido para obtener las respectivas geninas.

Cuando se buscaron las mejores condiciones para la reacción de hidrólisis de la digitoxina, tal como se describió en la síntesis del ácido $3\beta, 14\beta, 20(R,S)$ -trihidroxi-23-nor- 5β -colánico (20), se observó que el tiempo de reacción era crítico, ya que los

cardenólidos son poco estables frente a los ácidos, dando lugar a productos de deshidratación, principalmente derivados insaturados del tipo Δ^{14} . En el caso de obtener los glicósidos radiactivos era importante no tener pérdidas de marcación isotópica; por este motivo se decidió no hidrolizar los glicósidos aunque ésto implicaba trabajar con compuestos más polares.

En un principio se intentó separar los glicósidos por CLAR. Para ello, se hicieron pruebas con una mezcla de patrones de los tres glicósidos buscando las mejores condiciones para la separación de los mismos. Esto se logró con una mezcla de acetonitrilo:agua (56:44), utilizando una columna de fase inversa. La detección de los glicósidos se realizó con un detector ultravioleta a una longitud de onda de 225 nm. Cuando se intentó realizar la separación y colección de los glicósidos por CLAR preparativa no se logró obtener el resultado del ensayo analítico.

Se decidió, entonces, buscar condiciones para la separación de los tres glicósidos por CCD. Los glicósidos gitoxina y digoxina difieren únicamente en la posición de uno de sus hidroxilos, lo cual hace difícil su separación por CCD. En literatura ⁵⁶ se encontraron sólo dos mezclas de solventes que permitían la separación de los tres glicósidos y que eran metil-etil-cetona:tolueno (80:20) y cloruro de metileno:metanol:agua (90:10:0,25). Desarrollando dos veces la placa cromatográfica con la última de estas mezclas se obtuvieron los mejores resultados. En ésta, los valores de R_f de cada uno de los glicósidos resultaron ser: 0,75 (digitoxina), 0,60 (gito-

xina) y 0,40 (digoxina).

Una vez encontradas las mejores condiciones para la separación de los glicósidos por CCD, se aplicó esta metodología a la purificación del extracto vegetal conteniendo los glicósidos cardenólidos. Junto con el extracto se sembró, a un costado de la placa preparativa, una mezcla de los patrones correspondientes a los tres glicósidos. Luego de desarrollar dos veces la placa cromatográfica con el sistema 4, tapó la zona correspondiente al extracto con papel de aluminio y se reveló con ácido sulfúrico 50%, únicamente la mezcla de los patrones.

Se rasparon, entonces, las zonas de la placa correspondientes a los tres glicósidos y se eluyeron de la sílica con una mezcla de cloruro de metileno:metanol (70:30).

3. Análisis de las fracciones de glicósidos cardenólidos aisladas por CCD

Para llegar a establecer que los compuestos radiactivos sintetizados y luego administrados a plantas Digitalis purpurea eran intermediarios en el camino biosintético de cardenólidos, era necesario calcular los valores de incorporación específica (IE) y absoluta (IA) de estos posibles precursores en cada uno de los glicósidos cardenólidos.

La IE y la IA se definen, respectivamente, como:

$$IE = \frac{\text{radiactividad (dpm/mmol) (glicósido)}}{\text{radiactividad (dpm/mmol) (precursor)}} \times 100$$

$$IA = \frac{\text{radiactividad total (dpm) (glicósido)}}{\text{radiactividad total (dpm) (administrada)}} \times 100$$

Por lo tanto, para calcular los valores de IE era necesario conocer la masa de cada uno de los glicósidos aislados a partir del extracto.

Cuando se trabaja con plantas pequeñas (4 a 6 meses) la concentración de cardenólidos es aproximadamente de 0,1mg/g de planta fresca, según lo determinado por Evans y Cowley ^{1, 2}, por lo que estas bajas concentraciones hacen difícil su detección y cuantificación.

El análisis por CCD de las fracciones correspondientes a los tres glicósidos provenientes de la purificación de un extracto obtenido como ya se ha indicado, señaló que estas fracciones no estaban puras, sino que contenían manchas correspondientes a otros productos de la planta. Además, la masa de las fracciones era muy baja, siendo en algunos casos del orden del error de pesada.

Para solucionar estos inconvenientes se encaró otro método que permitiera determinar la masa de cada uno de los glicósidos presentes en las fracciones obtenidas por CCD (sistema 4), para luego utilizar ese dato para el cálculo de la IE.

Dado que los glicósidos cardenólidos absorben en la zona del ultravioleta a 225 nm, se intentó medir su absorbancia a esta longitud de onda y determinar su masa a partir de una curva de calibración (absorbancia vs concentración) obtenida a partir de soluciones de los glicósidos puros en metanol.

Se construyeron las curvas de calibración para digitoxina y gitoxina, según se muestra en las figuras 16 y 17.

Cuando se procedió a determinar la absorbancia de las fracciones correspondientes a cada uno de los tres glicósidos y de aquéllas correspondientes a otras zonas de la placa cromatográfica, luego de la purificación por CCD (sistema 4) del extracto vegetal, se observó que todas las fracciones presentaban absorción a 225 nm, por lo que este método no era útil para determinar la masa de cada uno de los glicósidos.

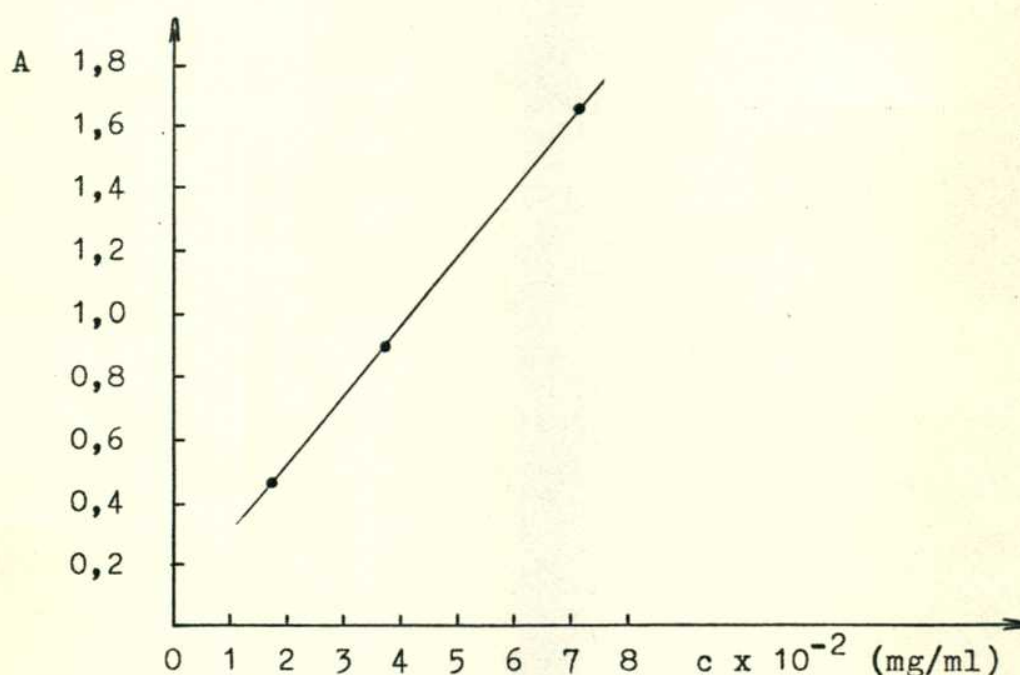


Figura 16: Representación de los valores de absorbancia (a 225 nm) de digitoxina en función de su concentración.

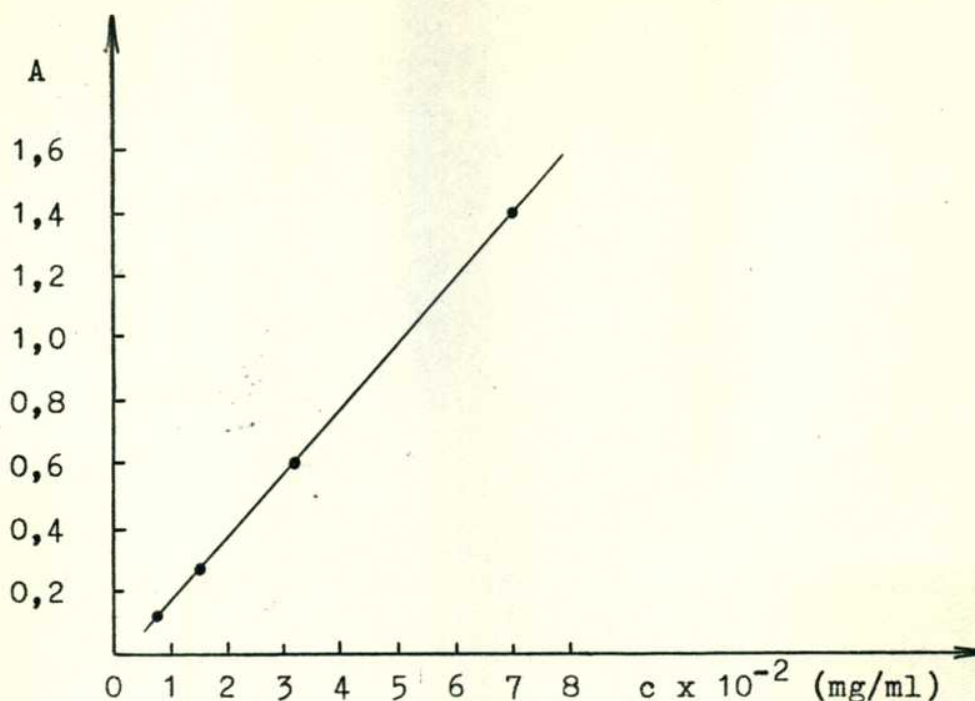


Figura 17: Representación de los valores de absorbancia (a 225 nm) de gitoxina en función de su concentración.

Dada la imposibilidad de obtener valores seguros de la masa de los glicósidos, se decidió determinar la IA únicamente.

Por otra parte, para facilitar la detección y la posterior purificación por recristalización de cada uno de los glicósidos aislados, se agregó al extracto una determinada cantidad de cada glicósido puro, previo a su purificación.

La dilución de cada uno de los glicósidos por el añadido de patrones auténticos permitió separarlos por CCD preparativa y purificarlos por sucesivas recristalizaciones, pero impidió la determinación segura de las masas presentes y por ende, el cálculo de la IE.

E. Método de inoculación de compuestos radiactivos

Para establecer el mejor método de administración de sustratos radiactivos a plantas de la especie Digitalis purpurea, se llevaron a cabo una serie de ensayos teniendo en consideración que en literatura se encuentran descriptas varias técnicas utilizando tanto plantas enteras ^{16, 57}, como hojas cortadas ^{17, 20}. Como en nuestro caso los productos a inocular eran insolubles en agua, para estos ensayos se utilizó progesterona-(1, 2, 6, 7-³H) como compuesto modelo, ya que había sido demostrado que la progesterona se incorporaba en los cardenólidos de la planta mencionada.

1. Ensayos con plantas enteras

El primero de estos ensayos consistió en administrar el precursor disuelto en acetona sobre la superficie de las hojas de una planta Digitalis purpurea. Las hojas habían sido previamente desengrasadas pasando un algodón embebido en acetato de etilo sobre la superficie de las mismas, lo cual favorecía la absorción del precursor.

Luego de la evaporación de la acetona, las hojas se pulverizaron con una solución de aceite de silicona 10% en éter de petróleo. El aceite de silicona se absorbe en pocas horas y provoca una absorción conjunta del precursor. Este tratamiento no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de las plantas, siempre y cuando la pulverización sea lo suficientemente

lenta como para permitir una evaporación rápida del éter de petróleo y el depósito de una película delgada de silicona.

Luego de varios días, algunas de las hojas administradas con el precursor radiactivo mostraban puntos marrones como resultado de la toxicidad de la acetona, pero la mayoría creció normalmente. Al cabo de 15 días, se lavó la superficie de las hojas con acetona para determinar la cantidad de progesterona-(1, 2, 6, 7-³H) no absorbida, que resultó ser del 16%. Se aislaron los glicósidos cardenólidos, según se explicó anteriormente y se midieron sus valores de radiactividad. Los valores de incorporación coincidieron con los hallados por otros autores ²⁰.

Un segundo ensayo realizado consistió en atravesar la base del tallo con una aguja de coser para pasar un hilo de algodón, el cual absorbía de un recipiente de vidrio una solución acuosa del precursor. En este caso, como la progesterona es insoluble en agua, se agregó Tween 20 para ayudar a su dispersión. Como en este ensayo se utilizaron 5 mg de progesterona, fue necesario agregar bastante Tween 20 para lograr una dispersión total, con lo cual, la solución resultó viscosa y el hilo tomaba por capilaridad sólo agua, por lo que la mayor parte de la radiactividad quedó retenida en el recipiente. Este método había sido probado por Reichstein ¹⁶ con muy buenos resultados, pero con mevalonato de amonio, soluble en agua. En general, no resulta aplicable a casos de precursores insolubles en agua, a menos que éstos puedan ser dispersados con muy poca cantidad de detergentes.

2. Ensayos con hojas cortadas

Previo al ensayo de administración de productos marcados, fue preciso determinar el tiempo que una hoja cortada de una planta Digitalis purpurea, podía mantenerse con su pedúnculo sumergido en un recipiente con una solución de nutrientes, sin sufrir modificaciones apreciables. Para ello, se cortó una hoja, se presionó suavemente su pedúnculo para romper los vasos y permitir una mejor absorción y se la colocó en un recipiente conteniendo 0,5 ml de agua. El espacio libre entre la hoja y el borde del recipiente se obturó con algodón hidrófugo, para evitar la evaporación del agua. Al cabo de una noche se completó la absorción casi total del agua y se realizaron sucesivos agregados de 0,3 ml de una solución salina cuya composición se puede ver en la tabla 1 ⁵⁸.

Con este tratamiento la hoja se mantuvo en buen estado durante 11 días.

Dado el resultado anterior, todos los ensayos sucesivos se llevaron a cabo con hojas separadas de la planta.

Uno de ellos consistió en cortar una hoja, aplastar suavemente su pedúnculo y colocarla en un recipiente con agua. En estas condiciones, se desengrasó su superficie con acetato de etilo y se aplicó sobre la hoja una solución de progesterona-(1, 2, 6, 7-³H) en acetona. Se pulverizó con una solución de aceite de silicona 10% en éter de petróleo y se la mantuvo en buen estado durante 10 días, alimentándola con solución salina. Al cabo de este período, se extrajo la progesterona no

absorbida que había quedado sobre la superficie de la hoja (32%) y, tal como se indicó anteriormente, se determinó la incorporación del precursor en los cardenólidos. En este caso, el valor de incorporación absoluta fue menor que en el ensayo correspondiente con una planta entera.

Tabla 1: Composición de la solución salina empleada en los ensayos con hojas de Digitalis purpurea.

sustancia	concentración
MgSO_4	1,8 g/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,5 g/l
Na_2SO_4	1,0 g/l
KCl	0,4 g/l
Na_2HPO_4	95 mg/l
MnCl_2	46 mg/l
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	16 mg/l
ZnSO_4	13 mg/l
H_3BO_3	7,5 mg/l
KI	3,8 mg/l
CuSO_4	20 g/l
MnO_3	2,5 g/l

Otro método probado consistió en colocar una hoja cortada en una solución acuosa del precursor, produciéndose la absor-

ción directamente. Se ensayó primero un compuesto soluble en agua como la mevalonolactona-(2-¹⁴C), obteniéndose un buen resultado de incorporación del precursor en los cardenólidos.

Se probó luego progesterona-(1, 2, 6, 7-³H) dispersada en agua con ayuda de Tween 20. En este caso, la hoja no se mantuvo en buen estado y no absorbió la totalidad de la solución, la cual tomó una coloración naranja probablemente debida a productos de oxidación de la hoja. Luego de 5 días se determinó que un 53% del precursor no había sido absorbido y que la incorporación en glicósidos cardenólidos había sido muy baja.

Teniendo en cuenta todos los resultados antes presentados, se decidió trabajar con plantas enteras administrando los compuestos radiactivos, disueltos en un solvente adecuado, mediante su aplicación sobre la superficie de las hojas.

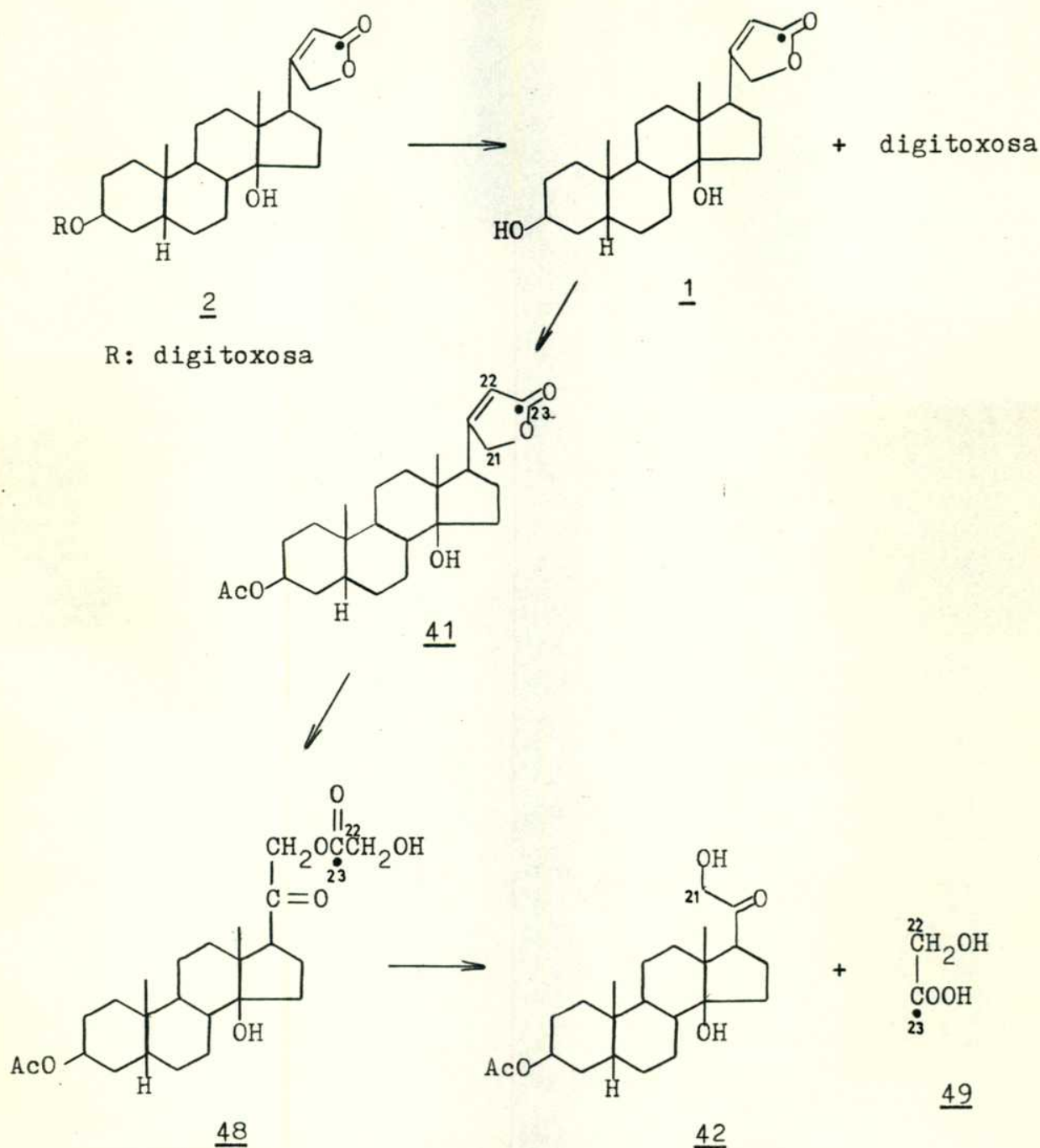
F. Degradación de digitoxina

Con el objeto de comprobar si la radiactividad se hallaba localizada únicamente en el anillo butenólido de los cardenólidos, o si por el contrario, se había producido una dispersión de la marca en la molécula de los mismos, como resultado de algún tipo de degradación de los precursores administrados, se procedió a la degradación de la digitoxina radiactiva ($2-^{14}\text{C}$) proveniente del ensayo de administración del ácido $3\beta,20(\text{R,S})$ -dihidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C ($19-^{14}\text{C}$).

El proceso degradativo se indica en la figura 18.

Siguiendo la secuencia degradativa de Leete et al. ¹⁴, la digitoxina (2) fue hidrolizada con ácido sulfúrico 0,1N, en metanol, rindiendo digitoxigenina (1) y el azúcar digitoxosa. La digitoxigenina se extrajo con cloruro de metileno, mientras que la digitoxosa permaneció en la fase acuosa. Por acetilación de la digitoxigenina se obtuvo 3β -acetil-digitoxigenina (41), la que fue sometida a una reacción de ozonólisis. El ozónido resultante se redujo con zinc y ácido acético, obteniéndose el éster glicólico (48), cuya hidrólisis con solución acuosa de bicarbonato de potasio al 10%, en metanol, rindió el ácido glicólico (49) y 3β -acetoxi- $14\beta,21$ -dihidroxi- 5β -pregnanolona (42).

Se pudieron aislar así el hidrato de carbono (digitoxosa), el compuesto 42 (que contiene los carbonos 20 y 21 del anillo butenólido) y el ácido glicólico (formado por los carbonos 22 y 23 del anillo lactónico) y medir la incorporación radiactiva en cada uno de ellos.



• C = ^{14}C

Figura 18: Degradación de digitoxina.

**ESPECTROMETRIA
DE
RMN - ¹³C**

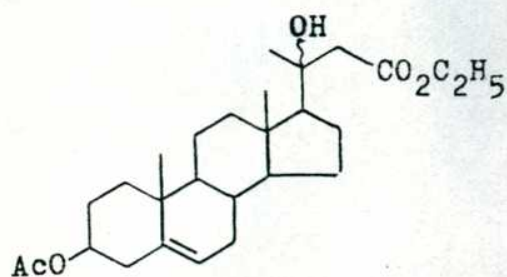
Introducción

El valor del desplazamiento químico obtenido por RMN- ^{13}C para un determinado átomo de carbono, refleja el entorno electrónico y estérico del mismo. Una de las características más importantes de los espectros de RMN- ^{13}C es el hecho de que, dentro de una familia de compuestos, un sustituyente dado produce efectos similares en el carbono al cual está unido y en aquellos carbonos que se encuentran cerca del sitio de sustitución. En general, los efectos del sustituyente se atenúan rápidamente a medida que aumenta la distancia al sitio de sustitución y, por lo tanto, los desplazamientos químicos del carbono que lleva el sustituyente y sus vecinos más inmediatos son los más importantes; éstos se conocen como efectos α , β y γ , respectivamente.

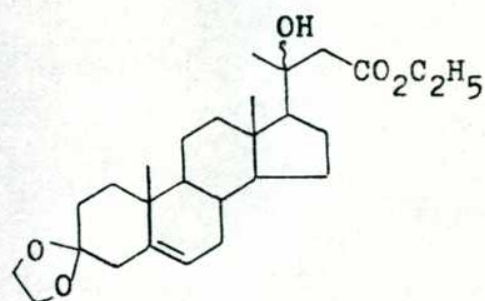
Los efectos sobre un determinado carbono de los grupos ubicados en relación β y γ respecto de él, son aproximadamente aditivos y se han publicado tablas con parámetros de apantallamiento para derivar los desplazamientos químicos de ^{13}C en hidrocarburos saturados, alcoholes, cetonas y algunas olefinas ⁵⁹. En algunos casos, carbonos más alejados del sitio de sustitución también exhiben desplazamientos característicos, en general, más pequeños. Es por ello que, en la asignación de espectros de RMN- ^{13}C , es muy útil la comparación con compuestos estrechamente relacionados ⁶⁰.

En el presente trabajo se han sintetizado derivados esteroideos que poseen, en varios casos, la misma cadena lateral

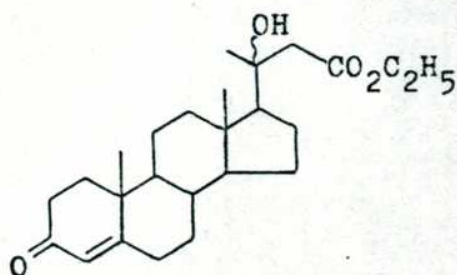
y difieren en la estructura del esqueleto esteroidal (figuras 19, 20, 21 y 22).



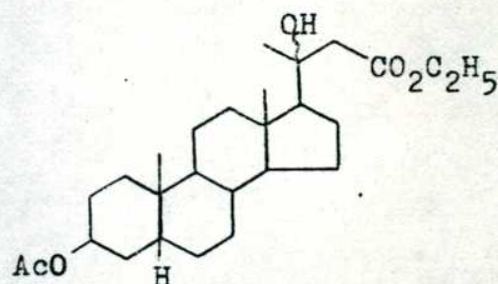
25



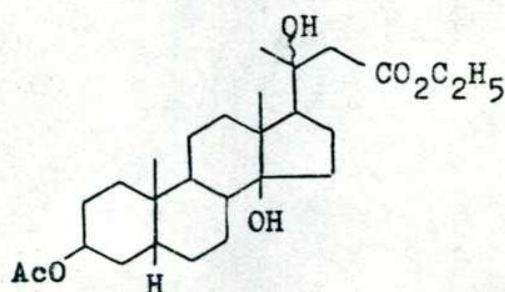
32



33



37



40

Figura 19: Familia de compuestos 25, 32, 33, 37 y 40.

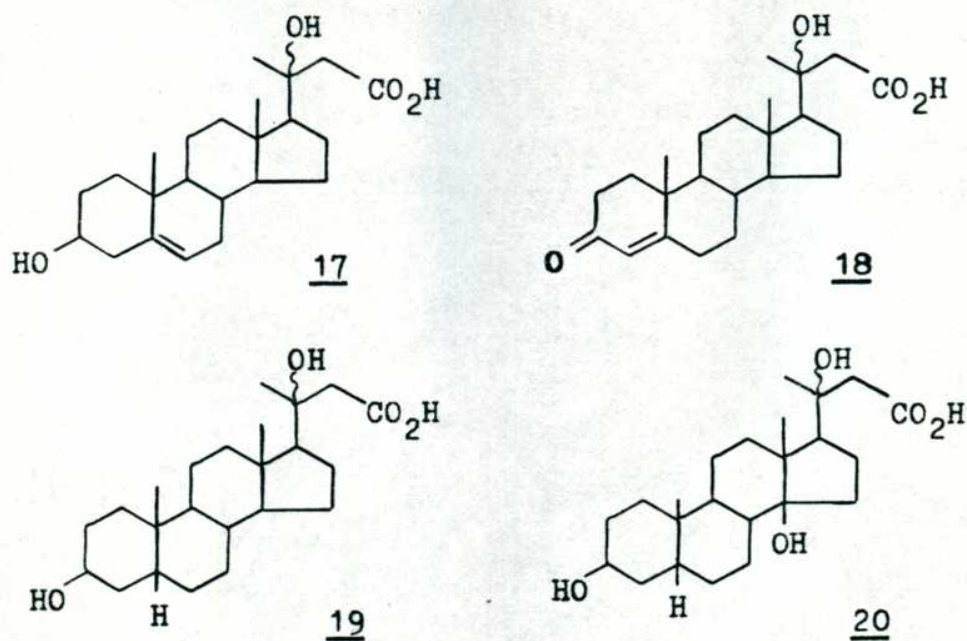


Figura 20: Familia de compuestos 17, 18, 19 y 20.

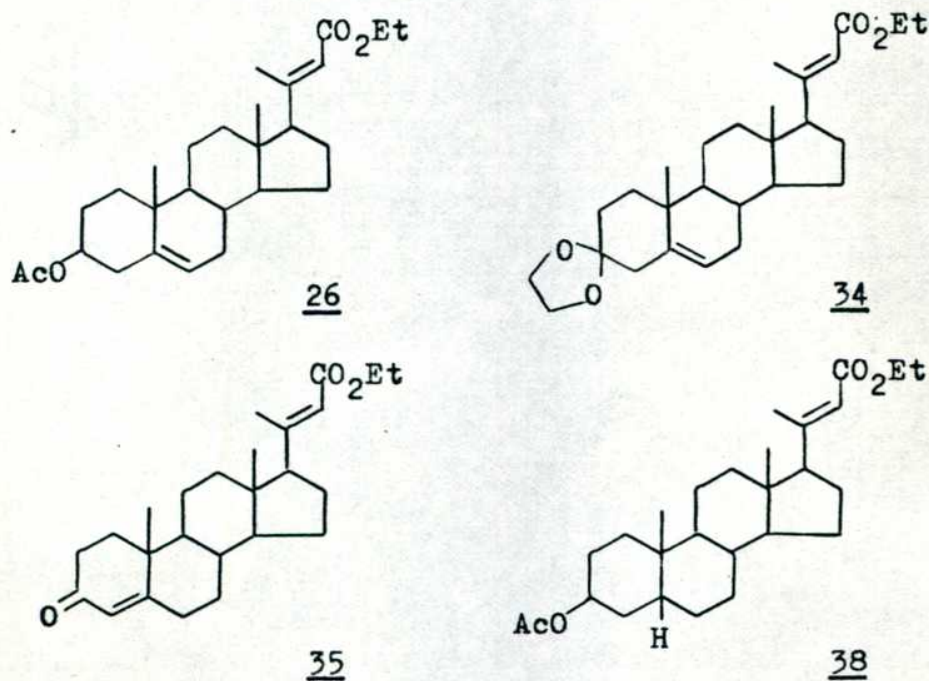


Figura 21: Familia de compuestos 26, 34, 35 y 38.

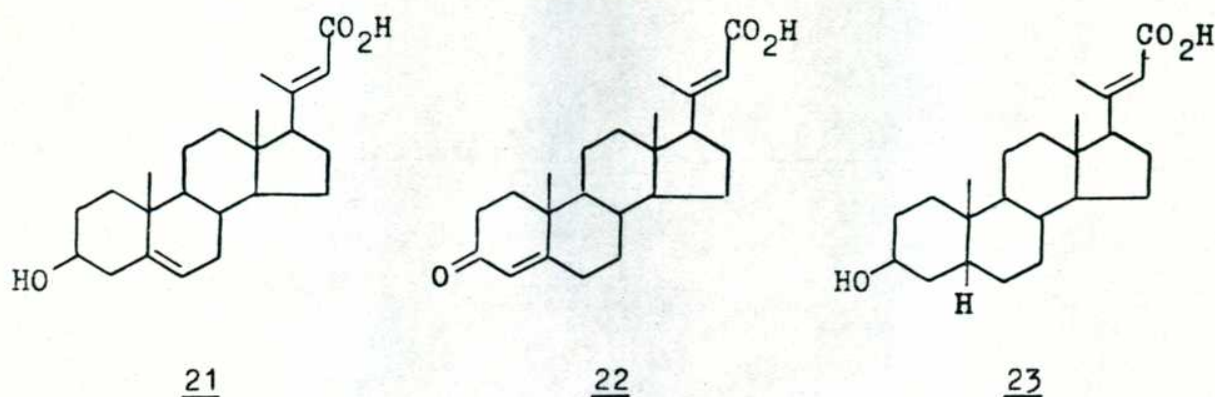


Figura 22: Familia de compuestos 21, 22 y 23.

En estos casos se observa que, dentro de cada familia, los átomos de carbono pertenecientes al anillo D, el grupo metilo de C-18 y los átomos de carbono de la cadena lateral, presentan valores de desplazamiento químico muy similares, independientemente de la configuración y de los aspectos funcionales de los anillos A y B.

Por otra parte, esteroides con distintas cadenas laterales pero el mismo esqueleto esteroideal (figuras 23 a 30), presentan, dentro de cada familia, prácticamente los mismos valores de desplazamiento químico para los átomos de carbono de los anillos A y B y el grupo metilo de C-19, independientemente del tipo de cadena lateral. Esta situación era previsible, dada la posición remota de estas modificaciones.

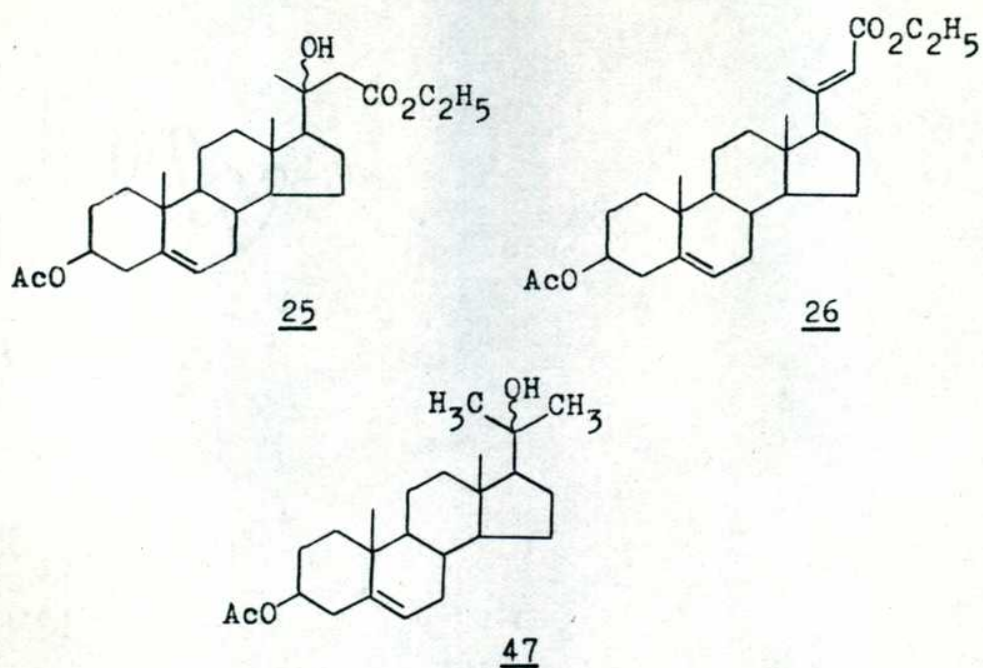


Figura 23: Familia de compuestos 25, 26 y 47.

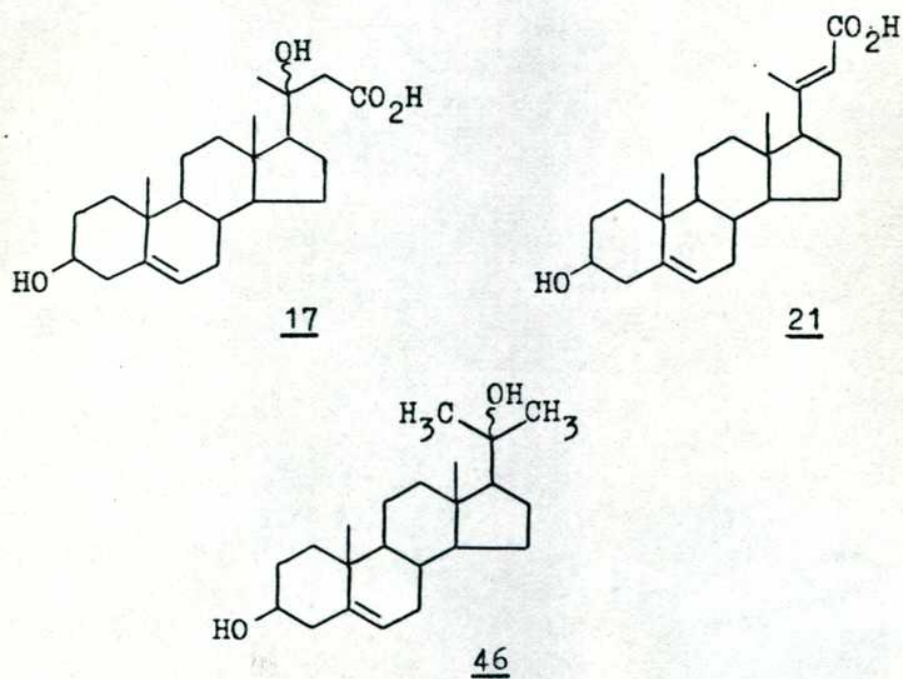


Figura 24: Familia de compuestos 17, 21 y 46.

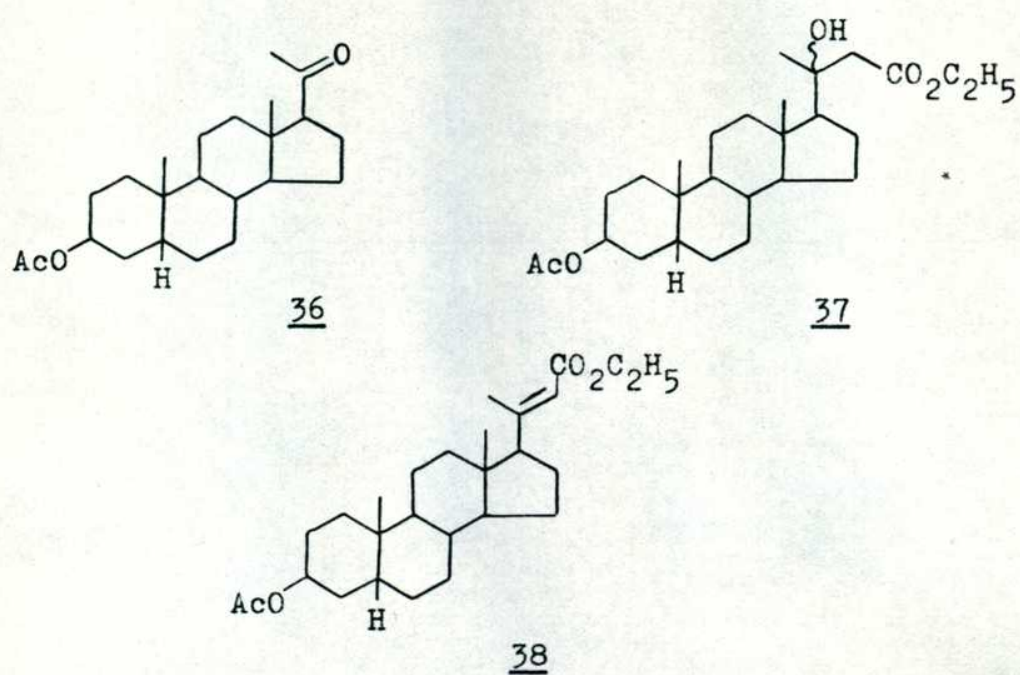


Figura 25: Familia de compuestos 36, 37 y 38.

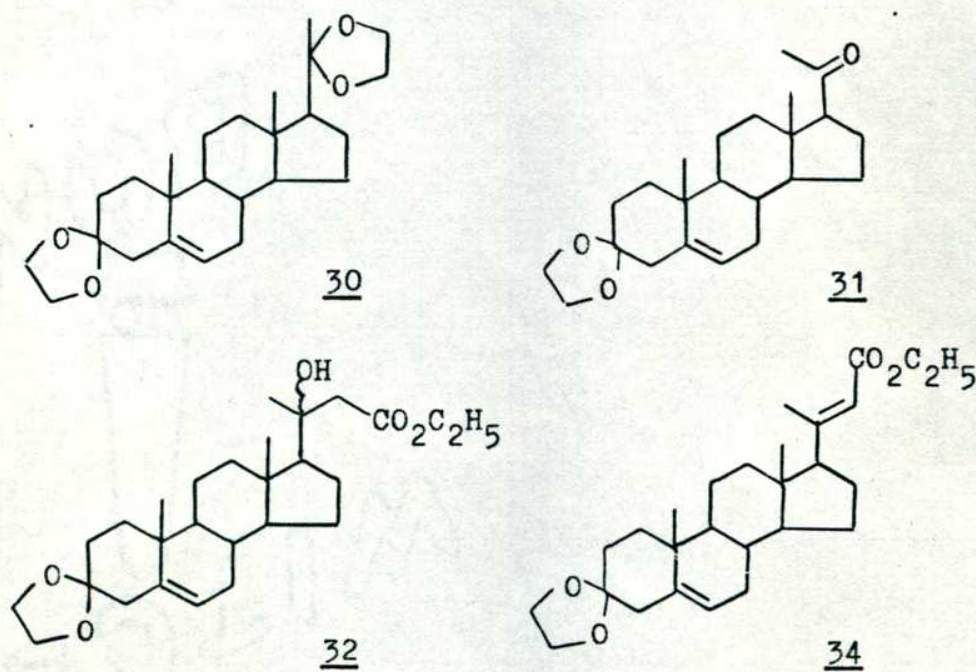
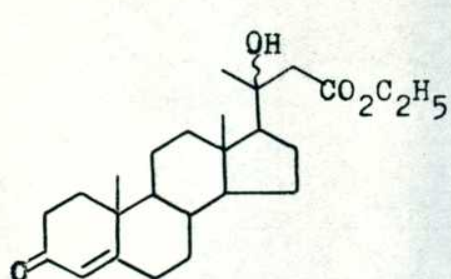
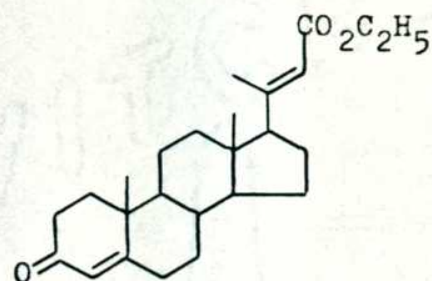


Figura 26: Familia de compuestos 30, 31, 32 y 34.

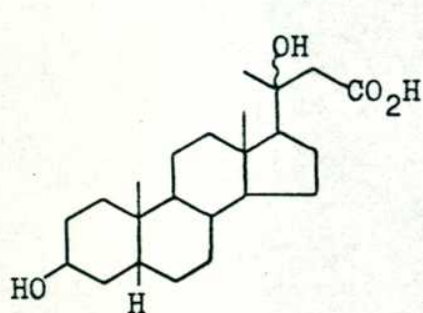


33

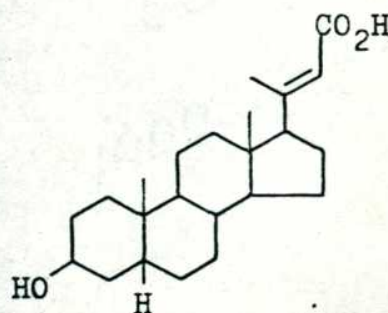


35

Figura 27: Familia de compuestos 33 y 35.

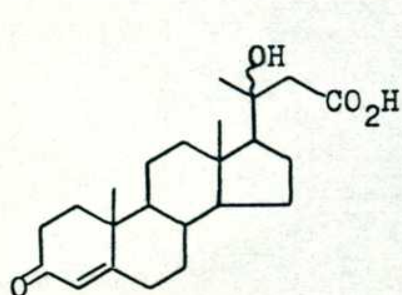


19

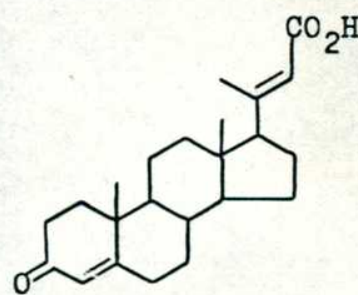


23

Figura 28: Familia de compuestos 19 y 23.

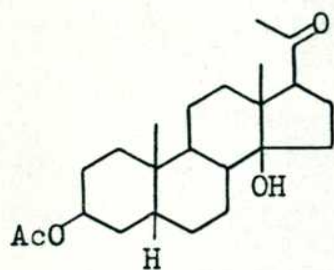


18

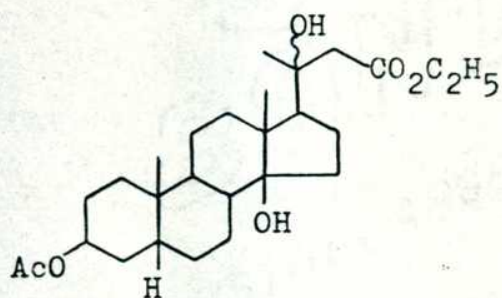


22

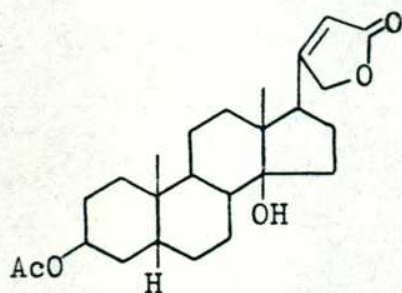
Figura 29: Familia de compuestos 18 y 22.



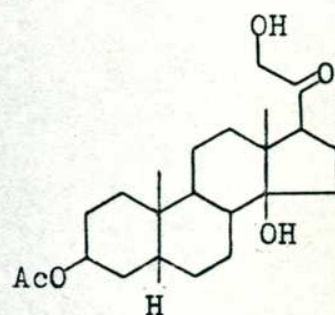
39



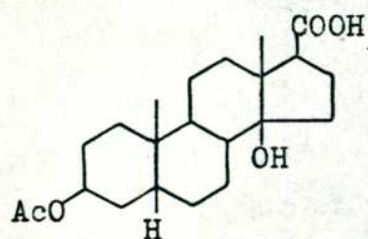
40



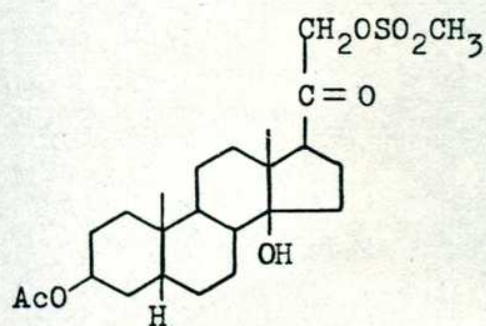
41



42



43



45

Figura 30: Familia de compuestos 39, 40, 41, 42, 43 y 45.

Las asignaciones de desplazamientos químicos a los distintos carbonos, tal como se encuentran en las tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7, fueron confirmadas por análisis de los respectivos espectros realizados por la técnica del test de protones vecinales (APT) ⁶¹, por comparación con datos de compuestos modelos y por valores conocidos de desplazamientos inducidos por un determinado sustituyente.

Se discutirán a continuación, los resultados obtenidos para grupos de derivados esteroideos cuya característica común es la cadena lateral que poseen.

1. Esteres etílicos de ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos

Tal como se describió anteriormente, los ésteres etílicos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos (familia de compuestos 25, 32, 33, 37 y 40; figura 19) fueron sintetizados por reacción de los 20-ceto-pregnanos correspondientes con bromoacetato de etilo y zinc, en condiciones de la reacción de Reformatsky, con excepción de 33 que se obtuvo por hidrólisis ácida del grupo cicloetilendioxo de C-3 del compuesto 32. El resultado de esta reacción fue la obtención de las mezclas de los epímeros en C-20. En el caso de los compuestos 25, 32 y 37, las mezclas fueron resueltas en sus dos componentes por CLAR preparativa. Ello permitió, tal como se indica en el Capítulo 3, caracterizar los epímeros 20R y 20S por espectroscopía de RMN-¹H.

Nos interesó, por lo tanto, estudiar por RMN- ^{13}C los efectos derivados por la quiralidad de C-20. Como la cadena lateral era la misma para ambos epímeros, las diferencias observadas por este método espectroscópico se deberían atribuir a factores estéricos surgidos del conformero favorecido en solución para cada uno de los epímeros.

Se estudiaron los carbonos que resultaron afectados por el cambio de configuración en C-20, para lo cual fue necesario establecer qué señales provenientes de un mismo carbono aparecían a diferentes valores de desplazamiento químico. El método que resultó más conveniente para este análisis, dado que las diferencias observadas para dichos carbonos eran pequeñas (menores que 1 ppm), fue efectuar primero el espectro de la mezcla de epímeros para observar las señales dobles y luego el espectro de cada uno por separado, permitiendo asignar las señales correspondientes a cada epímero.

De esta manera, el espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla 25 (20R+20S) presentó señales dobles para los carbonos 13, 14, 16, 18, 20, 21, 22 y para el carbono metilénico del éster etílico. La señal más intensa de cada uno de dichos pares debía corresponder al carbono perteneciente al isómero 20S, obtenido con un 62% de rendimiento en la mezcla. El resto de los carbonos presentaban señales únicas para ambos epímeros.

En el caso de la mezcla 37(20R+20S) se obtuvieron señales dobles para los mismos carbonos.

En los espectros de RMN- ^{13}C de las mezclas 32(20R+20S) y 33(20R+20S), dichos dobletes fueron observados para los

carbonos 16, 18, 20, 22 y el carbono metilénico del éster etílico, mientras que las pequeñas diferencias existentes entre los desplazamientos químicos de las señales de los carbonos 13, 14 y 21 no permitió su resolución, sino que la señal correspondiente al epímero minoritario (2OR) se presentaba como una inflexión de la correspondiente al mayoritario (2OS).

En el caso de la mezcla 40(2OR+2OS), la única señal doble del espectro de RMN- ^{13}C resultó la correspondiente a C-21, con una diferencia de 0,5 ppm entre las señales correspondientes al C-21 de ambos epímeros.

El análisis de los espectros de RMN- ^{13}C de cada uno de los epímeros resultantes de la separación por CLAR de las mezclas 25, 32 y 37, permitió asignar con seguridad las señales correspondientes a los carbonos de cada isómero puro, tal como se encuentra detallado en la tabla 3.

Las diferencias en desplazamiento químico entre aquellos carbonos que están afectados por la quiralidad de C-20 son pequeñas (menores de 1 ppm), siendo las más importantes las correspondientes a C-20 ($\Delta\delta$ 0,3-0,4 ppm), es decir el centro asimétrico, C-16 ($\Delta\delta$ 0,3-0,4 ppm), C-18 ($\Delta\delta$ 0,3 ppm) y C-22 ($\Delta\delta$ 0,2-0,3 ppm).

Aunque en algunos casos, la cadena lateral unida a C-17 puede rotar libremente, es sabido que, generalmente prefiere adoptar una conformación particular, ya que el hemiespacio superior de la molécula se encuentra en parte impedido por la presencia del grupo metilo de C-18. La conformación adoptada dependerá de la configuración y de los sustituyentes de C-20.

Este hecho se observa en el caso de compuestos del tipo 20-hidroxi-pregnano. A partir de datos de RMN- ^1H ^{62, 63} y por estudios de las energías relativas de los distintos conformeros ⁶⁴, se pudo establecer que en el $3\beta, 20\text{R}$ -dihidroxi- 5α -pregnano (50(20R)), la cadena lateral adopta una disposición espacial preferencial, conduciendo a una conformación estrellada en la cual el hidrógeno de C-20 se encuentra ubicado en posición anti con respecto al hidrógeno α de C-17 (figura 31). Esta conformación predomina en un 98% en el equilibrio.

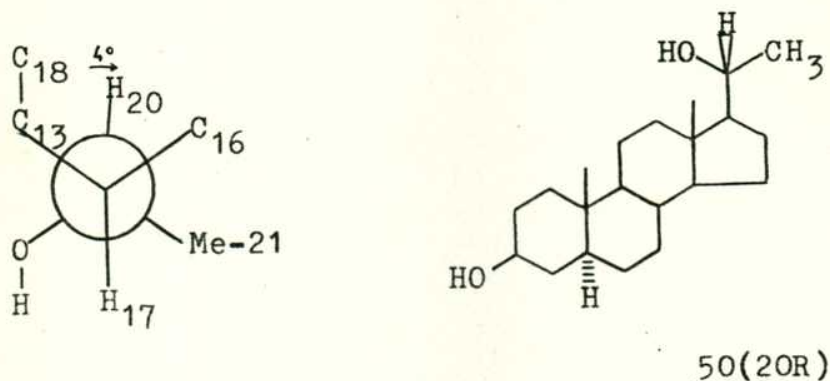


Figura 31: Proyección del enlace C-17/C-20 del conformero preferido en solución para el $3\beta, 20\text{R}$ -dihidroxi- 5α -pregnano (50(20R)).

En este caso, el grupo hidroxilo de C-20 se ubica cerca de C-12 y el grupo metilo de C-21, relativamente voluminoso, lo hace en una posición sinclinal con respecto a C-16.

En el caso del isómero 50(20S), en la conformación estrellada con el hidrógeno de C-20 anti con respecto al hidrógeno α de C-17, se produce un aumento en la energía del rotámero

debido a la proximidad de los grupos metilo de C-21 y C-18 (figura 32 a). Esta interacción favorece la existencia de una proporción significativa de otro rotámero de conformación estrellada, en el que el hidroxilo de C-20, antes que el hidrógeno de este carbono, se proyecta sobre el anillo D (figura 32 b). Esto es posible porque el oxígeno puede alejarse ligeramente de C-18, ya que sufre las repulsiones de los hidrógenos de este carbono.

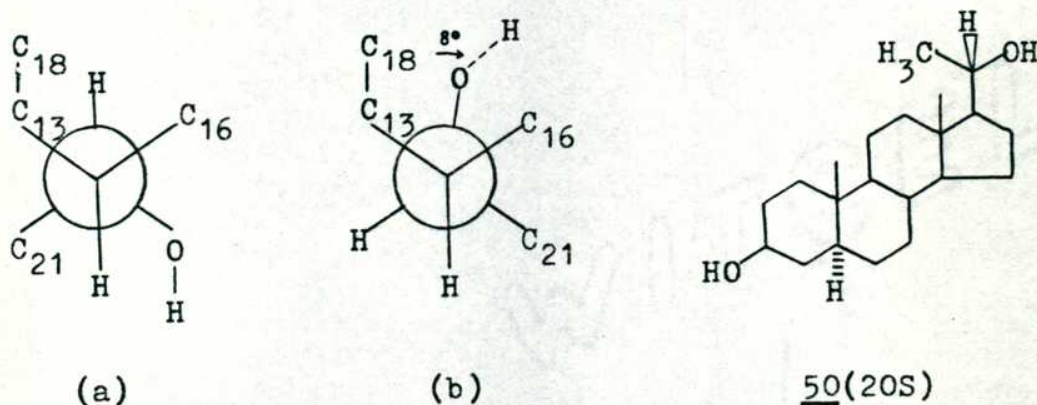


Figura 32: Proyecciones del enlace C-17/C-20 de los conformeros favorecidos en solución para el 3 β ,20S-dihidroxi-5 α -pregnano (50(20S)).

Los espectros de RMN- ^{13}C de los derivados de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos en estudio, no podían ser directamente correlacionados con los correspondientes a 3 β ,20R-dihidroxi-5 α -pregnano (50(20R)) y 3 β ,20S-dihidroxi-5 α -pregnano (50(20S)), debido a que, en nuestro caso, el hidrógeno de C-20 estaba sustituido por un grupo R ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) más voluminoso.

Para poder efectuar una correlación efectiva con compuestos modelos análogos a nuestros ésteres etílicos de los ácidos

20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos, se sintetizó el 3 β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno (47) el que, a semejanza de los compuestos en estudio, no contenía hidrógeno en el C-20. El compuesto modelo 47 fue analizado por espectroscopía de RMN- ^{13}C . Por los datos antes presentados, era factible asumir que el conformero favorecido en solución debería presentar al grupo hidroxilo de C-20 en posición anti con el hidrógeno α de C-17 (figura 33).

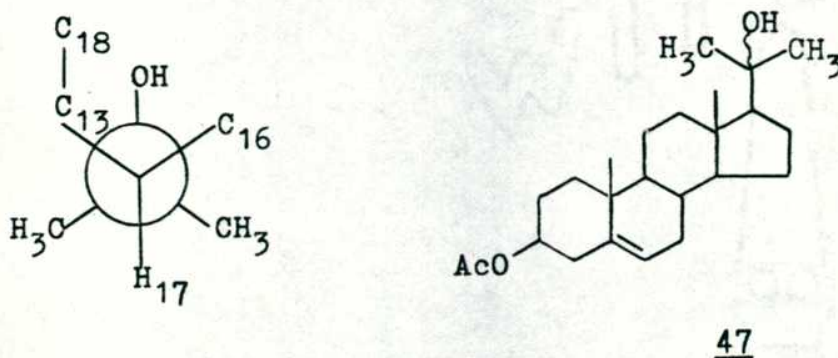


Figura 33: Proyección del enlace C-17/C-20 del conformero favorecido en solución para el 3 β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno (47).

Esta suposición se basa en consideraciones estereoquímicas ⁶⁵ que indicaban que el espacio adyacente al grupo metilo de C-18 de los esteroides, no puede acomodar fácilmente grupos unidos a C-20 que sean voluminosos con el grupo metilo de C-21. El apoyo definitivo a esta restricción de la libertad conformacional de la unión C-17/C-20 surgió luego también de una cantidad de observaciones, entre las que se encuentran las efec-

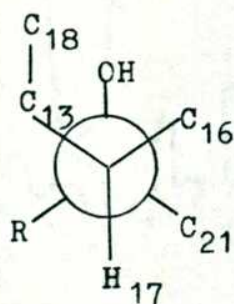
tuadas con 20-hidroxi-pregnanos y que se mencionaron anteriormente.

Por lo tanto, en el caso de la cadena lateral del 3β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno (47), al ser el hidroxilo unido al C-20 un grupo menos voluminoso que el metilo, presenta menor impedimento estérico que éste al enfrentarse con el grupo metilo de C-18. Comparándola con el caso más simple que presentaba el hidrógeno de C-20 anti al hidrógeno 17α (ver figura 32 a), la conformación mostrada en la figura 33 debe introducir una interacción entre el C-18 y el grupo hidroxilo de C-20 ⁶⁶, que se detecta en el estudio del espectro de RMN-¹³C del compuesto 47.

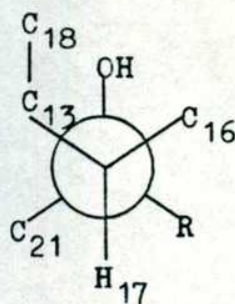
Teniendo en cuenta el modelo descripto, se propone para los ésteres etílicos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos, como conformación favorecida para ambos epímeros, una disposición estrellada con el grupo hidroxilo de C-20 ubicándose aproximadamente en relación espacial anti con respecto al hidrógeno de C-17 (figura 34).

Esta conformación justificaría el desplazamiento químico de C-18 hacia campos más bajos observado en todos estos derivados (δ 13,4-13,9 ppm), indicando de la misma manera que en el compuesto modelo 47 (δ de C-18: 13,5 ppm) que existe una compresión estérica debida a la interacción entre el grupo hidroxilo de C-20 y el metilo de C-18. Más aún, si en los compuestos esteroidales en estudio, el hidroxilo de C-20 está localizado en posición anti con respecto al hidrógeno 17α , el entorno químico de C-16 en el isómero 2OR es el mismo que el

de C-16 en el compuesto modelo 47 (ver figuras 33 y 34).



epímero 20R



epímero 20S

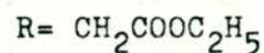


Figura 34: Proyecciones del enlace C-17/C-20 de los conformeros favorecidos en solución para los epímeros 20R y 20S de los ésteres etílicos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos.

Los desplazamientos químicos observados están de acuerdo con esta hipótesis, ya que el valor del desplazamiento químico de C-16 en el compuesto 47 es de 23,1 ppm y en el isómero 20R de los ésteres etílicos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos (25, 32, 33 y 37) este valor varía entre 23,0 y 23,1 ppm.

Por otra parte, en el isómero 20S (figura 34) el C-16 se encuentra en un entorno diferente y su valor de resonancia se presenta a 22,7-22,8 ppm.

En el caso del isómero 20S, el entorno químico para los carbonos 13 y 18 debe ser prácticamente el mismo que el que existe en el compuesto 47 (ver figuras 33 y 34). En el compuesto 47, estos carbonos resuenan a 42,7 y 13,5 ppm; en los

isómeros 20S de los compuestos 25, 32, 33 y 37, los valores de desplazamiento químico para C-13 y C-18 son de 42,7-43,1 ppm y de 13,4-13,6 ppm, confirmando la suposición anterior.

En los isómeros 20R estos valores son de 42,9-43,3 ppm y de 13,7-13,9 ppm, respectivamente.

En ambos casos, el grupo metilo de C-21 debe estar orientado hacia el lado α de la molécula, así como la cadena lateral, que debe evitar cualquier interacción con el núcleo esteroideal. De esta manera, los conformeros propuestos cumplen con las variaciones de los desplazamientos químicos observados. La presencia de la interacción entre el hidroxilo de C-20 y el grupo metilo de C-18 en los conformeros propuestos, no inhibe su existencia como los conformeros principales, como ha sido demostrado en el caso del $3\beta,20S$ -dihidroxi- 5α -pregnano ⁶³.

Es muy probable que en estos derivados la libertad de rotación alrededor del enlace C-17/C-20 esté restringida debido a la repulsión que existiría entre el grupo metilo de C-18 y cualquier grupo voluminoso unido a C-20. Es de suponer que esta interacción estérica (entre el grupo metilo de C-18 y el grupo R: $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) tendría mayor energía que aquella mencionada anteriormente entre el hidroxilo de C-20 y el grupo metilo de C-18.

2. Ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos

Los ácidos 17, 18, 19 y 20 (figura 20) fueron obtenidos

por hidrólisis de los respectivos ésteres etílicos (25, 33, 37 y 40), tal como se describe en la Parte Experimental. Por lo tanto, en todos los casos se obtuvo la mezcla de los epímeros 2OR y 2OS, siendo el 2OS el mayoritario. En estos casos, a diferencia de los ésteres etílicos correspondientes, se debió utilizar piridina como solvente para realizar los espectros de RMN- ^{13}C , debido a que, tanto el grupo hidroxilo de C-3 como el grupo carboxilo libre, los hacían insolubles en cloroformo.

Con respecto a la metodología utilizada, se efectuó primero el análisis de la mezcla de ambos epímeros y luego, con el propósito de la asignación individual de señales, el del epímero 17(2OS), obtenido por hidrólisis de 25(2OS). Conocidas las señales correspondientes al epímero 17(2OS), se pudieron asignar las del epímero 17(2OR) en el espectro de RMN- ^{13}C de la mezcla. En base a estos datos, se asignaron las señales correspondientes a cada uno de los epímeros en los espectros de RMN- ^{13}C de las mezclas 18(2OR+2OS), 19(2OR+2OS) y 20(2OR+2OS).

El espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 17 presentó señales dobles para los carbonos 13, 16, 18, 20, 21, 22 y 24. La señal correspondiente a C-14 no estaba resuelta en dos, pero presentaba una inflexión, lo cual indicaba que los valores de desplazamiento químico para este carbono eran muy semejantes en ambos epímeros.

Los compuestos 18 y 19 presentaron señales dobles para los carbonos 13, 14, 16, 18, 20, 21, 22 y 24, mientras que

el compuesto 20 sólo presentaba una señal doble, la correspondiente a C-21.

Al igual que en el caso de los ésteres etílicos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos, las diferencias en desplazamiento químico entre aquellos carbonos que presentaban señales dobles por estar afectados por la quiralidad de C-20, eran pequeñas. Las diferencias más importantes eran las correspondientes a C-22 (1,2-1,4 ppm), C-21 (0,4-0,5 ppm), C-20 (0,2-0,3 ppm), C-16 (0,2-0,3 ppm) y C-18 (0,2 ppm).

En el caso del compuesto 20, la diferencia en desplazamiento químico para C-21 ($\Delta\delta$ 1,3 ppm) era mayor que en el caso de los compuestos 17, 18 y 19.

Tal como se explicó en el caso de los ésteres etílicos correspondientes, las diferencias en desplazamiento químico observadas son asignables a interacciones estéricas en el conformero favorecido en solución para cada epímero.

En este caso se utilizó como compuesto modelo el 3 β ,20-dihidroxi-20-metil-pregn-5-eno (46) y se propusieron, para ambos epímeros, las mismas conformaciones que en el caso de los ésteres etílicos correspondientes (figura 35).

Kirk et al.⁶⁷ realizaron espectros de RMN-¹H, en piridina, de 20-hidroxi-pregnanos y demostraron que estos productos forman complejos lineales, por unión puente de hidrógeno entre el hidrógeno del hidroxilo de C-20 y la piridina.

En el caso de RMN-¹³C, la formación de estos complejos produce desplazamientos hacia campos más bajos de aquellos carbonos vecinos al C-20, en comparación con los valores que

se obtienen cuando se utiliza cloroformo como solvente. Los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos (17, 18 y 19) presentan, además, un complejamiento adicional de la piridina con el grupo carboxilo de C-24. Estos dos efectos contribuyen a los desplazamientos a campos más bajos de los carbonos 13, 14, 18, 21 y 22. En el caso del ácido 20, la presencia del grupo hidroxilo de C-14 hace más difícil una predicción al respecto.

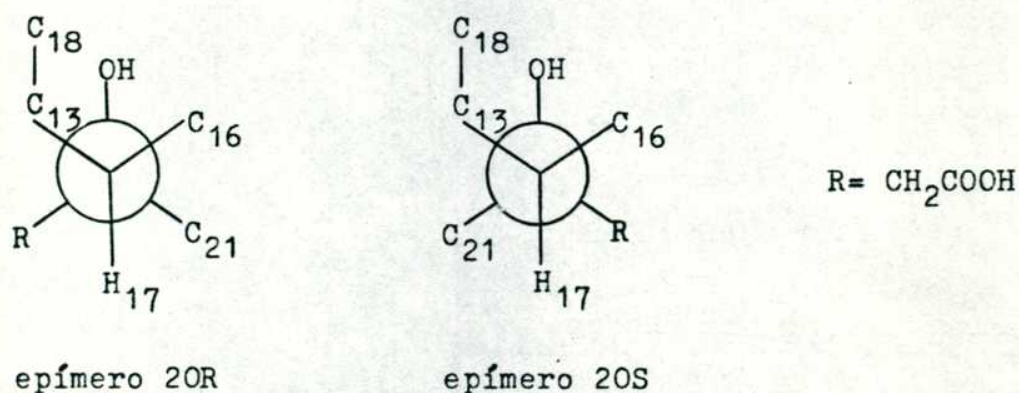


Figura 35: Proyecciones del enlace C-17/C-20 de los conformeros favorecidos en solución para los epímeros 20R y 20S de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos.

3. Esteres etílicos de los ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos

Tal como se describió anteriormente, los ésteres etílicos de los ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos (familia de compuestos 26, 34, 35 y 38; figura 21) fueron obtenidos por des-

hidratación, con oxiclорuro de fósforo en piridina, de los correspondientes ésteres etílicos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos (familia de compuestos 25, 32 y 37; figura 19), con excepción del compuesto 35 que se obtuvo por hidrólisis del grupo protector de C-3 del compuesto 34.

A semejanza con lo establecido en la serie de los ésteres etílicos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos, los compuestos 26, 34, 35 y 38 presentan valores de desplazamiento químico similares para los carbonos del anillo D, de la cadena lateral y para el grupo metilo de C-18.

En estos compuestos se observa un desplazamiento hacia campos más altos de la señal del grupo metilo de C-18 (del orden de 0,4 a 0,7 ppm) cuando se los compara con los compuestos 20(R,S)-hidroxilados correspondientes. Ello puede atribuirse a que, independientemente del doble enlace de la cadena lateral, estos compuestos ya no poseen el hidroxilo de C-20, el que interactuaba con el grupo metilo de C-18 produciendo un desplazamiento de su señal hacia campos más bajos.

El C-21 de estos ésteres etílicos de ácidos insaturados es uno de los carbonos más afectados por la introducción del doble enlace, presentando un desplazamiento hacia campos más altos de aproximadamente 6,1 a 6,3 ppm en comparación con su valor de resonancia en los compuestos 20-hidroxilados.

4. Acidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos

Por hidrólisis de los ésteres etílicos de los ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos (26, 35 y 38) se obtuvieron los compuestos 21, 22 y 23 (figura 22).

Estos productos presentan las mismas características que sus correspondientes ésteres etílicos cuando se los compara con los compuestos 20(R,S)-hidroxilados respectivos.

5. Compuestos 14 β -hidroxilados

La familia de compuestos 39, 40, 41, 42, 43 y 45 (figura 30) se caracterizan por poseer la configuración cis entre los anillos A/B y C/D, con un hidroxilo en C-14 con orientación β .

Comparando los valores de desplazamiento químico del C-20 en los 20-ceto-pregnanos 36 y 39, los cuales se diferencian únicamente en que 39 posee el hidroxilo 14 β , se observa un desplazamiento de la señal del citado carbono hacia campos más bajos, del orden de 8,63 ppm en el compuesto 39 (δ C-20: 217,4 ppm). Esta diferencia se debe a la presencia del hidroxilo 14 β , ya que la disposición espacial del mismo y del grupo carbonilo de C-20 permite la formación de un puente de hidrógeno entre ambos. Este puente de hidrógeno también aparece en el compuesto 42 (δ C-20: 216,9 ppm). En este caso podría haber competencia entre la formación de este puente de hidrógeno con otro similar que se establezca entre el hidroxilo de C-21 y el grupo carbonilo de C-20.

Por otra parte, el puente de hidrógeno formado entre el

hidroxilo 14β y el carbonilo de C-20 no se produce en el compuesto 45, posiblemente debido a la presencia del grupo sulfonato, el cual obliga a la cadena lateral a adoptar una orientación que aleja al grupo carbonilo de C-20 del hidroxilo 14β .

Tabla 2: Valores de desplazamiento químico de ^{13}C de los compuestos 30, 31 y 36.

carbono	<u>30</u>	<u>31</u>	<u>36</u>
1	36,30	36,30	30,43
2	31,07	31,03	24,84
3	109,40	109,34	70,31
4	41,77	41,71	30,59
5	140,01	139,98	37,11
6	121,92	121,73	(26,00)
7	31,45	31,62	(26,26)
8	31,65	31,85	35,48
9	49,67	49,54	39,70
10	36,65	36,61	34,74
11	20,85	21,05	20,94
12	39,40	38,81	39,06
13	41,77	43,94	44,12
14	56,56	56,85	56,55
15	23,85	24,47	24,26
16	23,01	22,83	22,73
17	63,16	63,60	63,61
18	12,89	13,21	13,29
19	18,89	18,86	23,63
20	111,80	209,14	208,80
21	24,54	31,62	31,31
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O} \\ \quad \diagup \\ \text{C} \\ \quad \diagdown \\ \text{CH}_2\text{O} \end{array} \text{ (C-3)}$	64,35 64,15	64,36 64,15	
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O} \\ \quad \diagup \\ \text{C} \\ \quad \diagdown \\ \text{CH}_2\text{O} \end{array} \text{ (C-20)}$	65,09		
CH_3COO			170,15
CH_3COO			21,31

Tabla 3: Valores de desplazamiento químico de ^{13}C del compuesto modelo 47 y de los ésteres etílicos de los ácidos 20 (R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos.

carbono	<u>47</u>	<u>25</u>	<u>25</u> (2OR)	<u>25</u> (2OS)
1	36,95	36,97	36,99	36,97
2	27,74	27,75	27,76	27,75
3	73,87	73,85	73,86	73,84
4	38,07	38,09	38,10	38,07
5	139,50	139,53	139,56	139,50
6	122,30	122,32	122,28	122,30
7	31,73	31,75	31,76	31,71
8	31,28	31,33	31,34	31,31
9	49,92	49,93	49,98	49,88
10	36,56	36,58	36,61	36,55
11	20,86	20,89	20,85	20,89
12	40,01	40,03	40,09	40,02
13	42,69	42,87 (2OR)	42,90	42,73
		42,76 (2OS)		
14	56,72	56,83 (2OS)	56,72	56,79
		56,68 (2OR)		
15	23,81	23,80	23,81	23,79
16	23,10	23,10 (2OR)	23,13	22,72
		22,74 (2OS)		
17	60,15	60,46	60,43	60,45
18	13,45	13,73 (2OR)	13,69	13,42
		13,42 (2OS)		
19	19,30	19,32	19,28	19,27
20	73,37	73,59 (2OR)	73,62	73,26
		73,27 (2OS)		
21	(30,95)	26,96 (2OR)	26,92	26,80
		26,82 (2OS)		
22	(30,05)	46,14 (2OS)	45,94	46,13
		45,89 (2OR)		
24		172,85	172,86	172,80
CH ₃ COO	170,26	170,21	170,17	170,21
CH ₃ COO	21,39	21,37	21,33	21,38
CO ₂ CH ₂ CH ₃		59,26 (2OS)	59,11	59,24
		59,06 (2OR)		
CO ₂ CH ₂ CH ₃		14,22	14,22	14,20

Tabla 3: continuación.

carbono	<u>32</u>	<u>32</u> (2OR)	<u>32</u> (2OS)	<u>33</u>
1	36,29	36,29	36,25	35,62
2	31,06	31,07	31,08	33,87
3	109,32	109,30	109,22	199,00
4	41,76	41,76	41,78	123,55
5	139,99	140,00	139,98	171,06
6	121,89	121,90	121,84	32,82
7	31,34	31,34	31,34	31,85
8	31,60	31,60	31,58	34,93
9	49,56	49,55	49,54	53,63
10	36,60	36,60	36,58	38,50
11	20,89	20,89	20,90	20,85
12	40,07	40,08	40,10	39,88
13	42,77	42,78	42,77	42,77
14	56,84	56,84	56,80	55,95
15	23,80	23,81	23,79	23,65
16	23,06 (2OR) 22,73 (2OS)	23,06	22,72	22,97 (2OR) 22,60 (2OS)
17	60,47	60,47	60,46	60,41
18	13,73 (2OR) 13,42 (2OS)	13,73	13,42	13,73 (2OR) 13,43 (2OS)
19	18,86	18,85	18,87	17,33
20	73,64 (2OR) 73,29 (2OS)	73,64	73,30	73,07
21	26,81	26,80	26,85	26,81
22	46,10 (2OS) 45,88 (2OR)	45,89	46,10	46,05 (2OS) 45,78 (2OR)
24	172,91	172,90	172,91	172,75
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O} \\ \quad \diagup \\ \text{C} \\ \quad \diagdown \\ \text{CH}_2\text{O} \end{array}$	64,36 64,15	64,35 64,15	64,30 64,20	
$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	59,21 (2OS) 59,05 (2OR)	59,05	59,20	59,06
$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	14,21	14,20	14,19	14,17

Tabla 3: continuación.

carbono	<u>37</u>	<u>37</u> (2OR)	<u>37</u> (2OS)	<u>40</u>
1	30,61	30,61	30,60	30,56
2	24,98	24,99	24,98	25,07
3	70,62	70,62	70,62	70,54
4	30,70	30,71	30,69	30,56
5	37,29	37,29	37,30	37,03
6	(26,02)	(26,03)	(26,02)	26,55
7	(26,46)	(26,46)	(26,44)	21,49
8	35,02	35,02	34,98	42,34
9	39,83	39,82	39,80	35,20
10	34,83	34,83	34,80	35,20
11	20,92	20,91	20,90	20,56
12	40,51	40,51	40,49	39,62
13	43,25 {2OR} 43,10 {2OS}	43,25	43,10	45,38
14	56,69 {2OS} 56,58 {2OR}	56,59	56,69	84,13
15	23,73	23,73	23,70	31,81
16	23,14 {2OR} 22,76 {2OS}	23,15	22,77	23,81
17	60,43	60,43	60,44	60,74
18	13,87 {2OR} 13,59 {2OS}	13,87	13,58	18,07
19	23,81	23,81	23,80	23,81
20	73,60 {2OR} 73,23 {2OS}	73,61	73,23	73,60
21	26,96 {2OR} 26,76 {2OS}	26,97	26,76	27,03 {2OR} 26,55 {2OS}
22	46,15 {2OS} 45,83 {2OR}	45,83	46,16	48,73
24	172,97	172,96	172,95	173,44
CH ₃ COO	170,39	170,40	170,41	170,49
CH ₃ COO	21,47	21,47	21,49	21,49
CO ₂ CH ₂ CH ₃	59,38 {2OS} 59,17 {2OR}	59,17	59,39	58,79
CO ₂ CH ₂ CH ₃	14,22	14,22	14,22	14,18

Tabla 4: Valores de desplazamiento químico de ^{13}C del compuesto modelo 46 y de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos.

carbono	<u>46</u>	<u>17</u>	<u>17(20S)</u>
1	37,87	37,78	37,73
2	32,64	32,51	32,50
3	71,26	71,17	71,11
4	43,49	43,37	43,35
5	141,90	141,72	141,71
6	121,10	121,03	121,00
7	32,25	32,09	32,02
8	31,95	31,62	31,57
9	50,56	50,41	50,35
10	36,96	36,87	36,81
11	21,37	21,25	21,25
12	40,59	40,38	40,35
13	43,07	43,10 (2OR) 43,00 (2OS)	43,00
14	57,24	57,02	57,09
15	24,32	24,18	24,13
16	23,63	23,33 (2OR) 23,12 (2OS)	23,12
17	60,89	59,15	59,20
18	13,79	14,00 (2OR) 13,81 (2OS)	13,73
19	19,67	19,60	19,52
20	72,05	73,33 (2OR) 73,17 (2OS)	73,11
21	(31,75)	28,07 (2OR) 27,62 (2OS)	27,59
22	(30,69)	48,01 (2OS) 46,80 (2OR)	48,04
24		175,56 (2OS) 175,39 (2OR)	175,50

Tabla 4: continuación.

carbono	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>
1	35,78	30,57	30,36
2	34,26	26,56	27,29
3	198,00	66,08	66,03
4	123,80	34,41	34,19
5	170,50	37,05	36,89
6	32,78	28,62	28,71
7	32,11	27,25	22,16
8	34,93	35,31	39,82
9	53,80	40,00	35,61
10	38,57	35,41	35,61
11	21,04	21,33	22,16
12	40,19	40,87	39,82
13	43,10 (2OR) 43,00 (2OS)	43,57 (2OR) 43,42 (2OS)	43,47
14	56,17 (2OS) 56,08 (2OR)	56,91 (2OS) 56,82 (2OR)	84,24
15	23,98	24,24	31,92
16	23,22 (2OR) 23,02 (2OS)	23,49 (2OR) 23,23 (2OS)	23,96
17	58,90	59,16	61,84
18	14,02 (2OR) 13,83 (2OS)	14,28 (2OR) 14,07 (2OS)	19,52
19	17,09	24,24	24,50
20	73,19 (2OR) 73,02 (2OS)	73,40 (2OR) 73,19 (2OS)	72,82
21	27,99 (2OR) 27,56 (2OS)	28,16 (2OR) 27,70 (2OS)	28,61 (2OR) 27,28 (2OS)
22	47,88 (2OS) 46,70 (2OR)	48,33 (2OS) 46,90 (2OR)	48,32
24	175,44 (2OS) 175,29 (2OR)	175,76 (2OS) 175,45 (2OR)	175,26

Tabla 5: Valores de desplazamiento químico de ^{13}C de los ésteres
etílicos de los ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos

carbono	<u>26</u>	<u>34</u>	<u>35</u>	<u>38</u>
1	36,99	36,35	35,62	30,63
2	27,75	31,09	33,85	25,03
3	73,81	109,27	199,37	70,61
4	38,09	41,79	123,65	30,77
5	139,56	140,08	171,16	37,36
6	122,21	121,76	32,77	26,14
7	32,14	31,66	31,82	26,45
8	31,72	32,20	35,78	35,96
9	50,09	49,78	53,75	40,10
10	36,62	36,67	38,31	34,94
11	21,01	21,07	20,97	21,08
12	38,47	38,57	38,57	38,94
13	44,47	44,48	44,38	44,84
14	56,53	56,60	55,68	56,48
15	24,94	24,98	24,82	25,03
16	24,30	24,37	24,13	24,26
17	60,33	60,33	60,12	60,52
18	12,96	13,02	13,02	13,18
19	19,34	18,93	17,33	23,83
20	159,70	159,71	159,33	159,80
21	20,65	20,71	20,61	20,71
22	115,91	115,91	116,07	115,91
24	166,80	166,70	166,70	166,77
CH_3COO	170,29			170,44
CH_3COO	21,39			21,50
$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	59,38	59,35	59,43	59,38
$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	14,35	14,44	14,33	14,39
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{O}' \end{array}$		64,39 64,18		

Tabla 6: Valores de desplazamiento químico de ^{13}C de los ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos

carbono	<u>21</u>	<u>22</u>	<u>23</u>
1	37,77	35,77	30,19
2	32,55	34,33	26,73
3	71,17	197,97	65,60
4	43,40	123,95	34,00
5	141,83	170,16	36,63
6	120,88	32,74	28,24
7	32,35	32,07	26,14
8	32,03	35,77	35,04
9	50,48	53,92	39,73
10	36,88	38,52	35,73
11	21,32	21,16	20,35
12	38,66	38,64	38,73
13	44,47	44,45	44,46
14	56,54	55,67	55,97
15	25,14	25,11	24,82
16	24,49	24,32	24,03
17	60,33	60,20	60,12
18	12,99	13,10	12,84
19	19,56	17,15	23,77
20	158,16	157,83	157,80
21	20,71	20,68	20,94
22	117,92	118,07	117,45
24	169,17	169,10	168,71

Tabla 7: Valores de desplazamiento químico de los compuestos
14 β hidroxilados

carbono	<u>41</u>	<u>43</u>	<u>42</u>	<u>45</u>	<u>39</u>
1	30,39	30,48	30,48	30,48	30,56
2	24,97	25,02	25,03	25,03	25,10
3	70,31	70,46	70,35	70,30	70,45
4	30,39	30,48	30,48	30,48	30,56
5	36,77	36,85	36,88	36,86	36,97
6	26,32	26,28	26,35	26,34	26,40
7	21,16	21,33	21,45	21,44	21,48
8	41,60	40,02	40,05	39,12	39,97
9	35,54	35,28	35,15	35,15	35,18
10	35,12	35,18	35,15	35,15	35,18
11	21,16	20,79	20,84	20,82	20,88
12	39,82	38,30	39,11	39,12	39,25
13	49,62	48,71	49,74	50,11	49,27
14	85,12	86,97	84,82	84,93	84,80
15	32,97	33,33	33,93	33,88	33,96
16	26,86	24,42	24,88	24,71	24,94
17	50,87	56,99	57,82	57,45	62,36
18	15,75	15,01	15,27	15,37	15,36
19	23,63	23,69	23,74	23,72	23,79
20	174,84	180,32	216,91	209,92	217,43
21	73,47		70,07	72,58	33,29
22	117,26				
23	174,42				
CH ₃ COO	170,42	170,59	170,39	170,39	170,43
CH ₃ COO	21,42	21,47	21,45	21,44	21,48
CH ₃ O ₂ S				40,10	

5

PRESENTACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

1. Inoculación de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos-24-¹⁴C y 23-norcol-20(22)(E)-énicos-24-¹⁴C en plantas Digitalis purpurea

Con el propósito de establecer la secuencia natural de uno de los últimos pasos del camino biosintético de los cardenólidos, es decir, el conducente a la formación del anillo lactónico de los mismos, se administraron las dos series de compuestos sintetizados (ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos-24-¹⁴C y 23-norcol-20(22)(E)-énicos-24-¹⁴C) a plantas Digitalis purpurea de 5 meses de desarrollo.

Los compuestos radiactivos, disueltos en un solvente adecuado, se aplicaron sobre la superficie de las hojas de una planta entera, con ayuda de un tubo capilar. Las hojas fueron previamente desengrasadas con acetato de etilo para favorecer la absorción del producto administrado y luego de la inoculación del mismo, se pulverizaron con una solución de aceite de silicona 10% en éter de petróleo.

Todas las experiencias tuvieron una duración de 14 días, al cabo de los cuales se sacó la planta de tierra y se cortaron sus hojas y sus raíces. La superficie de las hojas se lavó con una mezcla de cloruro de metileno:etanol (70:30), se llevó a volumen y se tomó una alícuota para determinar la radiactividad no absorbida por la planta.

El material vegetal se molió en un mortero con ayuda de arena lavada y se sometió a sucesivas extracciones con etanol 70%, a reflujo. Los extractos etanólico-acuosos se concentraron

y luego de evaporar el etanol, la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno. Se tomó una alícuota del extracto de cloruro de metileno, que contenía los cardenólidos, y se determinó su radiactividad. Por otra parte, se midió también la radiactividad de la fase acuosa extraída, la cual presentó en todos los ensayos un valor despreciable. En todos los casos, el porcentaje de radiactividad recuperada (la no absorbida más la metabolizada por la planta) fue superior al 92% de la radiactividad administrada.

La dilución de cada uno de los glicósidos cardenólidos, por el añadido de 2 mg de los patrones auténticos al extracto de cloruro de metileno, facilitó su separación por CCD preparativa (sistema 4). Posteriormente, se agregó a cada una de las fracciones aisladas 10-15 mg de los patrones puros y se purificó cada glicósido por sucesivas recrystalizaciones hasta un valor de actividad específica constante.

En las tablas 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se presentan los resultados correspondientes a la inoculación de cada uno de los ácidos sintetizados; y en la tabla 15 se resumen los valores de incorporación absoluta (IA) en cada uno de los tres glicósidos cardenólidos de los productos administrados.

Tabla 8: Resultados de la inoculación del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico-
-24-¹⁴C (17-¹⁴C).

Actividad específica de 17-¹⁴C: $2,60 \times 10^9$ dpm/mmol
 Cantidad de producto administrado: 1,8 mg
 Actividad total administrada: $1,22 \times 10^7$ dpm
 Actividad no absorbida: $0,96 \times 10^7$ dpm (equivalente a un 78,7% de la actividad administrada)
 Actividad en el extracto de cloruro de metileno: $0,21 \times 10^7$ dpm

Glicósido	antes de recrystalizar			luego de recrystalizar hasta valor constante				
	cant. (mg)	actividad total (1) (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	cant. (mg)	actividad total (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	actividad total (2) (dpm)	IA (3) (%)
Digitoxina	12,8	2,13 x 10 ⁴	0,17 x 10 ⁴	4,7	0,60 x 10 ⁴	0,13 x 10 ⁴	1,63 x 10 ⁴	0,6
Gitoxina	11,8	0,61 x 10 ⁴	0,05 x 10 ⁴	6,2	0,31 x 10 ⁴	0,61 x 10 ⁴	0,61 x 10 ⁴	0,2
Digoxina	12,4	10,06 x 10 ⁴	0,81 x 10 ⁴	2,6	0,11 x 10 ⁴	0,04 x 10 ⁴	0,50 x 10 ⁴	0,2

- (1) correspondiente a la fracción aislada por purificación del extracto por CCD (sistema 4).
 (2) actividad total corregida en función del % de actividad retenida luego de recrystalizar hasta valor constante.
 (3) calculada en base a la radiactividad absorbida por la planta.

Tabla 2: Resultados de la inoculación del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico-
-24-¹⁴C (18-¹⁴C).

Actividad específica de 18-¹⁴C: $2,33 \times 10^9$ dpm/mmol
 Cantidad de producto administrado: 3,2 mg
 Actividad total administrada: $2,00 \times 10^7$ dpm
 Actividad no absorbida: $1,70 \times 10^7$ dpm (equivalente a un 85,1% de la actividad administrada)
 Actividad en el extracto de cloruro de metileno: $0,14 \times 10^7$ dpm.

Glicósido	antes de recrystalizar			luego de recrystalizar hasta valor constante				
	cant. (mg)	actividad total (1) (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	cant. (mg)	actividad total (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	actividad total (2) (dpm)	IA (3) (%)
Digitoxina	17,2	2,47 x 10 ⁴	0,14 x 10 ⁴	9,0	0,36 x 10 ⁴	0,04 x 10 ⁴	0,71 x 10 ⁴	0,2
Gitoxina	16,5	2,83 x 10 ⁴	0,17 x 10 ⁴	11,6	0,17 x 10 ⁴	0,02 x 10 ⁴	0,33 x 10 ⁴	0,1
Digoxina	17,3	37,36 x 10 ⁴	2,16 x 10 ⁴	6,7	0,20 x 10 ⁴	0,03 x 10 ⁴	0,52 x 10 ⁴	0,2

- (1) correspondiente a la fracción aislada por purificación del extracto por CCD (sistema 4).
 (2) actividad total corregida en función del % de actividad retenida luego de recrystalizar hasta valor constante.
 (3) calculada en base a la radiactividad absorbida por la planta.

Tabla 10: Resultados de la inoculación del ácido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-nor-5 β -colánico-24-¹⁴C (19-¹⁴C).

Actividad específica de 19-¹⁴C: $2,22 \times 10^9$ dpm/mmol
 Cantidad de producto administrado: 2,8 mg
 Actividad total administrada: $1,64 \times 10^7$ dpm
 Actividad no absorbida: $1,39 \times 10^7$ dpm (equivalente a un 84,8% de la actividad administrada)
 Actividad en el extracto de cloruro de metileno: $0,13 \times 10^7$ dpm

	antes de recrystalizar			luego de recrystalizar hasta valor constante				
	cant. (mg)	actividad total (1) (dpm)	actividad especifica (dpm/mg)	cant. (mg)	actividad total (dpm)	actividad especifica (dpm/mg)	actividad total (2) (dpm)	IA (3) (%)
Glicósido								
Digitoxina	14,8	1,88 x 10 ⁴	0,13 x 10 ⁴	7,9	0,40 x 10 ⁴	0,50 x 10 ³	0,72 x 10 ⁴	0,3
Gitoxina	15,3	27,82 x 10 ⁴	1,82 x 10 ⁴	5,3	0,13 x 10 ⁴	0,24 x 10 ³	0,37 x 10 ⁴	0,2
Digoxina	16,9	38,68 x 10 ⁴	2,29 x 10 ⁴	6,6	0,23 x 10 ⁴	0,35 x 10 ³	0,59 x 10 ⁴	0,2

- (1) correspondiente a la fracción aislada por purificación del extracto por CCD (sistema 4).
 (2) actividad total corregida en función del % de actividad retenida luego de recrystalizar hasta valor constante.
 (3) calculada en base a la radiactividad absorbida por la planta.

Tabla 11: Resultados de la inoculación del ácido 3 β ,14 β ,20(R,S)-trihidroxi-23-nor-5 β -colánico-24-¹⁴C (20-¹⁴C).

Actividad específica de 20-¹⁴C: 2,18 x 10⁹ dpm/mmol
 Cantidad de producto administrado: 3,3 mg
 Actividad total administrada: 1,64 x 10⁷ dpm
 Actividad no absorbida: 1,49 x 10⁷ dpm (equivalente a un 90,9% de la actividad administrada)
 Actividad en el extracto de cloruro de metileno: 0,06 x 10⁷ dpm

	antes de recrystalizar			luego de recrystalizar hasta valor constante				
	cant. (mg)	actividad total (1) (dpm)	actividad especifica (dpm/mg)	cant. (mg)	actividad total (dpm)	actividad especifica (dpm/mg)	actividad total (2) (dpm)	IA (3) (%)
Glicósido								
Digitoxina	12,0	1,57 x 10 ⁴	0,13 x 10 ⁴	4,0	0,48 x 10 ⁴	0,12 x 10 ⁴	1,45 x 10 ⁴	1,0
Gitoxina	12,6	1,67 x 10 ⁴	0,13 x 10 ⁴	5,9	0,35 x 10 ⁴	0,06 x 10 ⁴	0,77 x 10 ⁴	0,5
Digoxina	12,9	45,26 x 10 ⁴	3,51 x 10 ⁴	2,0	1,20 x 10 ⁴	0,60 x 10 ⁴	7,74 x 10 ⁴	5,2

- (1) correspondiente a la fracción aislada por purificación del extracto por CCD (sistema 4).
- (2) actividad total corregida en función del % de actividad retenida luego de recrystalizar hasta valor constante.
- (3) calculada en base a la radiactividad absorbida por la planta.

Tabla 12: Resultados de la inoculación del ácido 3β-hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-
-24-¹⁴C (21-¹⁴C).

Actividad específica de 21-¹⁴C: $2,29 \times 10^9$ dpm/mmol
 Cantidad de producto administrado: 2,0 mg
 Actividad total administrada: $1,28 \times 10^7$ dpm
 Actividad no absorbida: $0,90 \times 10^7$ dpm (equivalente a un 70,5% de la actividad administrada)
 Actividad en el extracto de cloruro de metileno: $0,31 \times 10^7$ dpm

Glicósido	antes de recrystalizar			luego de recrystalizar hasta valor constante				
	cant. (mg)	actividad total (1) (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	cant. (mg)	actividad total (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	actividad total (2) (dpm)	IA (3) { %}
Digitoxina	17,4	11,46 x 10 ⁴	0,66 x 10 ⁴	6,1	4,02 x 10 ⁴	0,66 x 10 ⁴	11,46 x 10 ⁴	3,0
Gitoxina	17,1	16,31 x 10 ⁴	0,95 x 10 ⁴	11,4	7,18 x 10 ⁴	0,63 x 10 ⁴	10,87 x 10 ⁴	2,9
Digoxina	19,3	5,02 x 10 ⁴	0,26 x 10 ⁴	8,9	2,32 x 10 ⁴	0,26 x 10 ⁴	5,02 x 10 ⁴	1,3

- (1) correspondiente a la fracción aislada por purificación del extracto por CCD (sistema 4).
 (2) actividad total corregida en función del % de actividad retenida luego de recrystalizar hasta valor constante.
 (3) calculada en base a la radiactividad absorbida por la planta.

Tabla 13: Resultados de la inoculación del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico-
-24- ^{14}C (22- ^{14}C)

Actividad específica de 22- ^{14}C : $1,38 \times 10^9$ dpm/mmol

Cantidad de producto administrado: 1,4 mg

Actividad total administrada: $0,53 \times 10^7$ dpm

Actividad no absorbida: $0,42 \times 10^7$ dpm (equivalente a un 79,2% de la actividad administrada)

Actividad en el extracto de cloruro de metileno: $0,07 \times 10^7$ dpm

Glicósido	antes de recrystalizar			luego de recrystalizar hasta valor constante				
	cant. (mg)	actividad total (1) (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	cant. (mg)	actividad total (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	actividad total (2) (dpm)	IA (3) {%}
Digitoxina	18,2	0,52 x 10 ⁴	0,29 x 10 ³	9,1	0,26 x 10 ⁴	0,29 x 10 ³	0,52 x 10 ⁴	0,5
Gitoxina	14,0	6,11 x 10 ⁴	4,36 x 10 ³	11,7	0,46 x 10 ⁴	0,39 x 10 ³	0,55 x 10 ⁴	0,5
Digoxina	13,3	1,40 x 10 ⁴	1,05 x 10 ³	8,8	0,34 x 10 ⁴	0,39 x 10 ³	0,52 x 10 ⁴	0,5

- (1) correspondiente a la fracción aislada por purificación del extracto por CCD (sistema 4).
- (2) actividad total corregida en función del % de actividad retenida luego de recrystalizar hasta valor constante.
- (3) calculada en base a la radiactividad absorbida por la planta.

Tabla 14: Resultados de la inoculación del ácido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-énico-24-¹⁴C (23-¹⁴C).

Actividad específica de 23-¹⁴C: $2,42 \times 10^9$ dpm/mmol

Cantidad de producto administrado: 2,5 mg

Actividad total administrada: $1,68 \times 10^7$ dpm

Actividad no absorbida: $1,62 \times 10^7$ dpm (equivalente a un 96,2% de la actividad administrada)

Actividad en el extracto de cloruro de metileno: $0,03 \times 10^7$ dpm

Glicósido	antes de recrystalizar			luego de recrystalizar hasta valor constante				
	cant. (mg)	actividad total (1) (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	cant. (mg)	actividad total (dpm)	actividad específica (dpm/mg)	actividad total (2) (dpm)	IA (3) (%)
Digitoxina	14,9	$0,92 \times 10^4$	$0,62 \times 10^3$	7,8	$0,17 \times 10^4$	$0,22 \times 10^3$	$0,32 \times 10^4$	0,5
Gitoxina	14,0	$0,31 \times 10^4$	$0,22 \times 10^3$	7,6	$0,16 \times 10^4$	$0,20 \times 10^3$	$0,29 \times 10^4$	0,5
Digoxina	14,4	$0,35 \times 10^4$	$0,24 \times 10^3$	8,8	$0,17 \times 10^4$	$0,19 \times 10^3$	$0,28 \times 10^4$	0,5

(1) correspondiente a la fracción aislada por purificación del extracto por CCD (sistema 4).

(2) actividad total corregida en función del % de actividad retenida luego de recrystalizar hasta valor constante.

(3) calculada en base a la radiactividad absorbida por la planta.

Tabla 15: Resultados de incorporación absoluta (IA) en cardenólidos de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos-24-¹⁴C y 23-norcol-20(22)(E)-énicos-24-¹⁴C.

Compuesto administrado	IA (%)		
	Digitoxina	Gitoxina	Digoxina
Acido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico-24- ¹⁴ C (<u>17</u> - ¹⁴ C)	0,6	0,2	0,2
Acido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico-24- ¹⁴ C (<u>18</u> - ¹⁴ C)	0,2	0,1	0,2
Acido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-nor-5 β -colánico-24- ¹⁴ C (<u>19</u> - ¹⁴ C)	0,3	0,2	0,2
Acido 3 β ,14 β ,20(R,S)-trihidroxi-23-nor-5 β -colánico-24- ¹⁴ C (<u>20</u> - ¹⁴ C)	1,0	0,5	5,2
Acido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-24- ¹⁴ C (<u>21</u> - ¹⁴ C)	3,0	2,9	1,3
Acido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico-24- ¹⁴ C (<u>22</u> - ¹⁴ C)	0,5	0,5	0,5
Acido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-énico-24- ¹⁴ C (<u>23</u> - ¹⁴ C)	0,5	0,5	0,5

2. Discusión de los resultados obtenidos

La incorporación de precursores en compuestos sintetizados por plantas depende de varios factores. En primer término el tipo de vegetal y la forma de desarrollo que ha tenido (hidropónico, en tierra, etc.), luego el modo de administración del precursor, el sitio del vegetal donde se lo aplique, la edad y condición de la planta, la estación del año y otros factores ambientales. En el caso de plantas del género Digitalis, se ha observado que dentro de una misma especie, por ejemplo Digitalis purpurea, la proporción de glicósidos que contiene depende del origen de la planta; así, por ejemplo, para estudios similares al que nos ocupa, diversos autores en otras latitudes utilizaron plantas Digitalis con un alto contenido en digitoxina y un bajo contenido en los otros dos glicósidos, hecho que no se presenta en los ejemplares utilizados en este trabajo.

Todos estos elementos contribuyen a que la comparación de datos obtenidos en condiciones no similares, como son las del presente trabajo y las realizadas por otros autores en otros países, pueda conducir a conclusiones no estrictamente válidas.

En la tabla 15 se han presentado los resultados de incorporación absoluta (IA) en cada uno de los tres glicósidos de las dos series de compuestos administrados.

Los valores de incorporación absoluta obtenidos para los ácidos 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico-24-¹⁴C (17-¹⁴C),

3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico-24- ^{14}C ($\underline{18}$ - ^{14}C) y 3β , 20(R,S)-dihidroxi-23-nor- 5β -colánico ($\underline{19}$ - ^{14}C), que poseen un hidroxilo en C-20, son inferiores a los valores de incorporación en cardenólidos de compuestos tipo 20-ceto-pregnano, los cuales, según los datos registrados en la literatura, varían entre 1,5 y 2,5%.

Además de considerar el hecho ya señalado de la dudosa importancia que en este tipo de experimentos puede tener la comparación de datos obtenidos en otros laboratorios, los relativamente bajos valores de incorporación encontrados para los ácidos 17, 18 y 19 podrían ser explicados teniendo en cuenta que estos ácidos fueron administrados como mezclas de los epímeros 20R y 20S, y como los procesos biosintéticos ocurren estereoespecíficamente, sólo uno de los epímeros de la mezcla será utilizado en la construcción del anillo lactónico. Este factor contribuye a disminuir el valor de incorporación de cada una de estas mezclas en los cardenólidos.

Si comparamos los valores de incorporación de los ácidos $\underline{17}$ - ^{14}C , $\underline{18}$ - ^{14}C y $\underline{19}$ - ^{14}C con los correspondientes a los ácidos α,β no saturados respectivos, es decir $\underline{21}$ - ^{14}C , $\underline{22}$ - ^{14}C y $\underline{23}$ - ^{14}C , se observa que éstos últimos son más altos, particularmente para el ácido $\underline{21}$ - ^{14}C . Los ácidos α,β no saturados poseen una cadena lateral con una estereoquímica definida, por lo que en estos casos no se presenta el problema existente en los derivados 20(R,S)-hidroxilados, donde sólo uno de los epímeros podría ser utilizado. Este hecho puede ser el responsable del ligero aumento en incorporación de los ácidos 22 y 23, respecto de 18

y 19.

Con respecto al ácido 3β -hidroxi-23-norcol-5,20(22)(E)-diénico-24- ^{14}C (21- ^{14}C), sus valores de incorporación en los tres glicósidos cardenólidos son muy superiores a los de los ácidos 20(R,S)-hidroxilados (17- ^{14}C , 18- ^{14}C y 19- ^{14}C), y también respecto de los ácidos α,β no saturados 22- ^{14}C y 23- ^{14}C , lo que implica que es un mejor precursor de los cardenólidos.

Considerados en conjunto, los datos de incorporación de los ácidos 20(R,S)-hidroxilados (17, 18 y 19) y sus correspondientes productos de deshidratación (21, 22 y 23) pueden considerarse significativos, indicando la existencia de una ruta biosintética hacia los cardenólidos, que involucra intermediarios de tipo ácidos 23-norcolánicos.

Según el camino biosintético postulado en base a los resultados de los ensayos realizados, fundamentalmente por Caspi y Tschesche, (ruta v-z en la figura 36), la saturación del doble enlace de C-5 de pregnenolona (precursor de cardenólidos) debía pasar por un intermediario 3-ceto- Δ^4 para llegar a la estructura 3β -hidroxi-5 β -H (anillos A y B en cis) de un cardenólido. Por lo tanto, si los ácidos administrados se incorporaran en cardenólidos en ese orden de modificación del sistema de anillos A y B, eran de esperar valores de incorporación más altos para los ácidos 19- ^{14}C y 23- ^{14}C que para 18- ^{14}C y 22- ^{14}C respectivamente, los que a su vez deberían ser mejores precursores que los ácidos 17- ^{14}C y 21- ^{14}C .

Los resultados obtenidos por nosotros no condicen con la secuencia propuesta por los autores indicados. Esta alteración

en el orden debería ser atribuida al diferente tipo de cadena lateral que tienen nuestros compuestos comparados con los 20-ceto-pregnanos antes ensayados.

Por lo anterior es dable suponer que cuando la cadena lateral presenta todos los carbonos necesarios para la formación del anillo lactónico, el camino biosintético de los cardenólidos es distinto al postulado para el caso de precursores tipo 20-ceto-pregnano.

Con respecto a las dos cadenas laterales probadas, la correspondiente al ácido α, β no saturado es más efectiva y con respecto a la estructura del esqueleto esteroideal, la planta aparentemente puede utilizar en mayor magnitud aquélla correspondiente a pregnenolona. Por consiguiente, es posible postular una ruta alternativa para la biosíntesis de los glicósidos cardenólidos, tal como se indica en la figura 36.

Como los valores de incorporación de los ácidos $22-^{14}\text{C}$ y $23-^{14}\text{C}$ son mucho más bajos que en el caso de $21-^{14}\text{C}$, la planta introduciría primero el hidroxilo en C-14 con orientación β , saturaría luego el doble enlace de C-5 o en otra posición, e introduciría el hidroxilo de C-21 para la formación del anillo lactónico.

Estos resultados estarían indicando que la hidroxilación en C-14 con orientación β , resultaría más efectiva cuando la molécula presenta la insaturación entre los carbonos 5 y 6 para propiciar hipotéticamente, por migración del doble enlace no conjugado, una reacción de hidroxilación alílica en el C-14.

Es interesante destacar que en la biosíntesis de bufadienólidos de origen animal, el colesterol, que posee un sistema tetracíclico idéntico al de los compuestos 17 y 21 es mejor precursor que el coprostanol, cuyo sistema tetracíclico es semejante al de los compuestos 19 y 23 ⁶⁸.

Aún teniendo en cuenta las diferencias existentes entre los tipos de productos cardioactivos estudiados y entre los organismos en los que se estudian sus respectivos procesos biosintéticos (cardenólidos en vegetales por una parte y bufadienólidos en animales por la otra) resulta sugestiva la similitud de resultados, considerando que ambos tipos de productos naturales contienen funciones oxigenadas en C-14 con orientación β .

Los valores de incorporación en los cardenólidos de los compuestos 18-¹⁴C, 19-¹⁴C, 22-¹⁴C y 23-¹⁴C, todos inferiores al 1%, hacen suponer que si la planta dispone de ellos, los utiliza en la biosíntesis de los cardenólidos por algún camino alternativo (rutas a, b, g, i - a, b, f, h - a, c, e, h), distinto del camino utilizado por los compuestos 17-¹⁴C y 21-¹⁴C.

Por otra parte, el valor de incorporación del ácido 3β , 14β , $20(R,S)$ -trihidroxí-23-nor- 5β -colánico-24-¹⁴C (20-¹⁴C) en digitoxina (1%) indica que, aún para la mezcla epimérica $20(R+S)$, este compuesto es mejor precursor de cardenólidos que los ácidos 17-¹⁴C, 18-¹⁴C, 19-¹⁴C, 22-¹⁴C y 23-¹⁴C, pero su cadena lateral no es tan efectiva como la del ácido 21-¹⁴C, aunque de un valor comparable, ya que el proceso biológico debe utilizar uno de los epímeros. Por lo tanto, la formación

in vivo del compuesto 20 se produciría por el camino a, b, g (figura 36), encontrándose en la ruta aparentemente menos directa al cardenólido.

Sería de esperar que ensayos similares con los ácidos 3β , 14β -dihidroxi-23-nor- 5β -col-20(22)(E)-énico y 3β , 14β -dihidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico, indicados en la figura 36 con recuadro punteado, podrían llegar a establecer la ruta más eficiente para estos compuestos que contienen todos los carbonos necesarios para formar los cardenólidos. Las secuencias sintéticas para sus respectivas preparaciones se vieron dificultadas por la presencia del hidroxilo terciario ubicado en posición 14, el que resulta extremadamente lábil en las condiciones utilizadas para la obtención de los productos listados en la tabla 15.

Tal como se mencionó anteriormente, la introducción del hidroxilo 12β para la formación de digoxina (4) puede ocurrir en la etapa de 21C (pregnano) o en la de 23C (cardenólido). El valor de incorporación del ácido 20- ^{14}C en digoxina (5%) indicaría que este compuesto es un precursor eficiente de este glicósido, ya que la planta podría alternativamente deshidratar la cadena lateral, introducir el hidroxilo 12β y posteriormente el de C-21, o hidroxilar primero C-12 con orientación β y luego completar la síntesis del anillo lactónico. La transformación de digitoxina (2) en digoxina (4) también puede contribuir a incrementar este excelente dato de incorporación.

Los valores de incorporación registrados en la tabla 15 señalan que la formación del glicósido gitoxina (3) seguiría

un camino semejante al planteado para digoxina (4). En este caso, la hidroxilación en C-16 debería producirse en la etapa del intermediario con cadena lateral abierta, o sea, antes que la hidroxilación en C-21. Para las experiencias con los precursores conteniendo un hidroxilo en C-20, los valores registrados, levemente menores para gitoxina (3) que para digitoxina (2), son concordantes con el hecho de que el glicósido más hidroxilado necesita de un paso más de hidroxilación (en C-16).

Los resultados con los precursores insaturados no confirman esa simple suposición, ya que resultaron prácticamente iguales para ambos glicósidos.

En consecuencia, nuestros resultados estarían indicando la existencia de una ruta alternativa para la formación del anillo butenólido en la biosíntesis de cardenólidos.

En la "ruta de los pregnanos" propiciada por otros autores, la secuencia de modificaciones en el sistema anular sería distinta a la encontrada para la "ruta de los ácidos norcolánicos", aunque como ya se indicó, resulta arriesgado para este tipo de investigaciones en organismos vivientes, comparar resultados no llevados a cabo en paralelo y en idénticas condiciones, para llegar a establecer conclusiones definitivas.

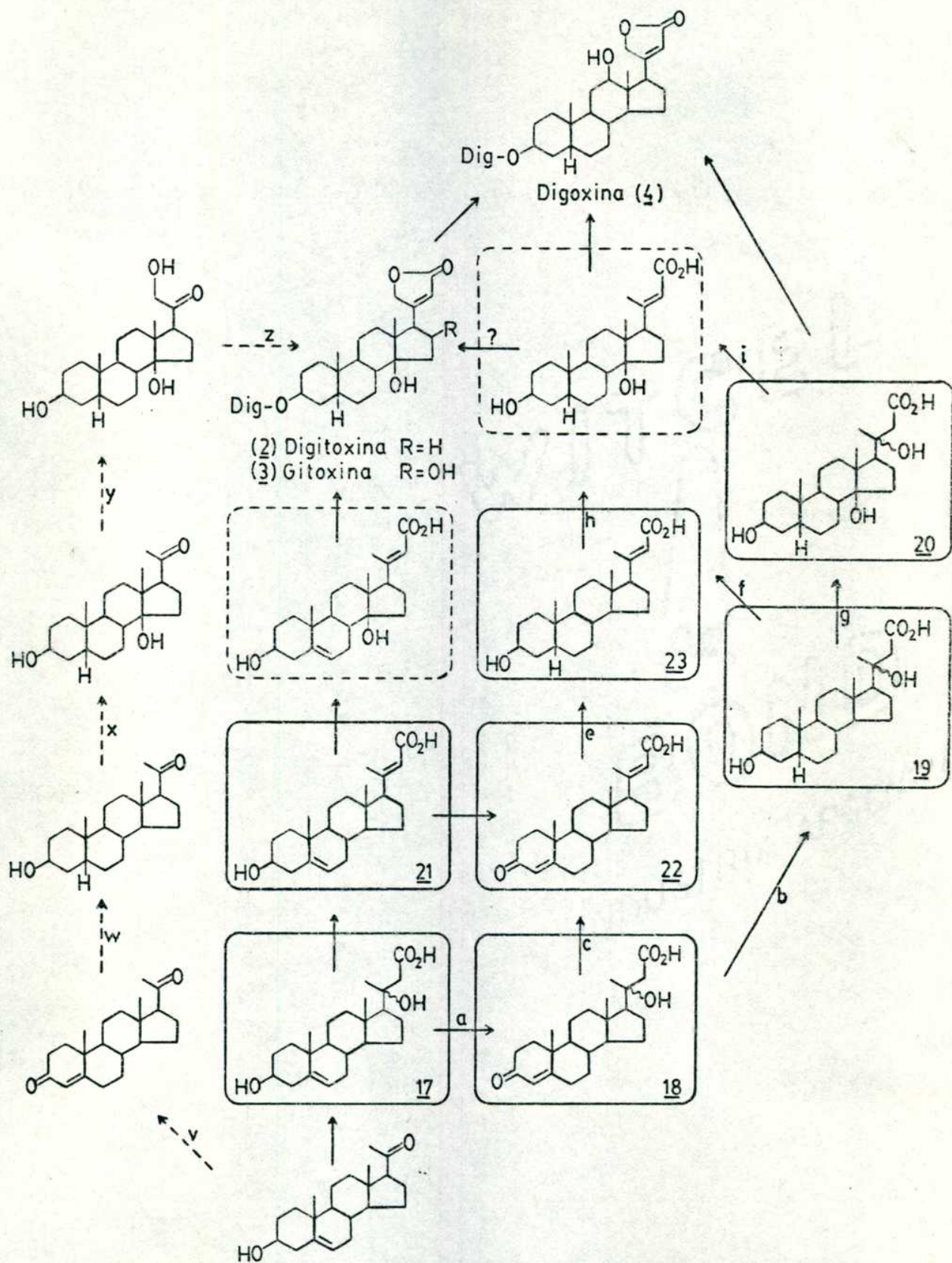
Por otra parte, los tejidos vegetales se caracterizan por no mostrar especificidad en cuanto a sus sistemas enzimáticos y en muchas y variadas oportunidades han demostrado capacidad para biosintetizar productos naturales utilizando precursores que se le administran, aunque éstos no sean los que realmente

utiliza cuando no los tiene a su disposición.

En conclusión, y aún teniendo en consideración todas las posibilidades de variabilidad antes planteadas, que son tanto aplicables para éstas como para otras experiencias biosintéticas, nuestros resultados nos llevan a proponer la existencia de una ruta alternativa, diferente a la "de los pregnanos", para la transformación in vivo de pregnenolona en cardenólidos, fundamentalmente en lo concerniente a la construcción del anillo butenólido.

Figura 36: Caminos hipotéticos de biosíntesis de los glicósidos digitoxina, gitoxina y digoxina en la planta Digitalis purpurea.

(con recuadro de trazo grueso se indican los compuestos utilizados en este trabajo. Con recuadro punteado se indican probables intermediarios no probados experimentalmente. Con flechas punteadas está indicada la "ruta de los pregnanos", propuesta por otros autores).



3. Degradación de digitoxina-¹⁴C (2-¹⁴C)

Por otra parte, como los compuestos administrados presentaban marcación radiactiva en el C-24, la misma debía hallarse localizada en el -23 del anillo lactónico de los cardenólidos, siempre y cuando no se produjera algún tipo de degradación de los productos inoculados, que condujera a una dispersión de la marca en la molécula de los glicósidos cardenólidos.

Con el objeto de comprobar que la radiactividad se hallaba localizada en el anillo lactónico de los cardenólidos, se llevó a cabo la degradación de la digitoxina proveniente de uno de los ensayos de inoculación de los compuestos sintetizados, según la secuencia degradativa descrita en la página 101 (figura 18).

Del análisis de los valores de radiactividad de las distintas fracciones obtenidas (tabla 16), se concluye que no se produjo una distribución de la marca, sino que la misma se encuentra localizada en su totalidad en el ácido glicólico (49-¹⁴C), formado por los carbonos 22 y 23 del anillo butenólido.

Tabla 16: Productos de degradación de digitoxina ($2\text{-}^{14}\text{C}$) derivada del ácido 3β ,
 $20(\text{R,S})$ -dihidroxi- $23\text{-nor-}5\beta$ -colánico- $24\text{-}^{14}\text{C}$ ($19\text{-}^{14}\text{C}$).

Compuesto	actividad (dpm/mmol)	act. relativa (%)
Digitoxina ($2\text{-}^{14}\text{C}$)	$1,49 \times 10^6$	100
Digitoxigenina ($1\text{-}^{14}\text{C}$)	$1,50 \times 10^6$	101
Fase acuosa (digitoxosa)	$<0,01 \times 10^6$	0
3β -acetil-digitoxigenina ($41\text{-}^{14}\text{C}$)	$1,52 \times 10^6$	102
3β -acetoxi- 14β , 21 -dihidroxi- 5β -pregnan- 20-ona (42) $<0,01 \times 10^6$		0
Fase acuosa (ácido glicólico ($49\text{-}^{14}\text{C}$))	$1,50 \times 10^6$	101

6

PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fisher-Johns y no han sido corregidos.

Los espectros de absorción en el infrarrojo (IR) se realizaron en dispersión en Nujol con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 421 o con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 710 B.

Las mediciones de absorción en el ultravioleta (UV) se realizaron en solución de metanol con un espectrofotómetro Beckman DK-2A.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN- ^1H) se realizaron a 60 MHz con un espectrómetro Varian A-60 y a 100 MHz con un espectrómetro Varian XL-100-15. Los solventes deuterados utilizados se indican en cada caso, en todas las determinaciones se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C) se realizaron a 25,2 MHz con un espectrómetro Varian XL-100-15, trabajando con transformada de Fourier, con una computadora 620/L-100 y una unidad de discos magnéticos Sykes 7000.

Los desplazamientos químicos se expresan en δ (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz; las señales se indican en cada caso como s: singulete, d: doblete, t: triplete, c: cuarteto, m: multiplete, o ba: banda ancha.

Los espectros de masa (EM) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masa Varian-MAT CH-7A, comandado por una

computadora Varian-MAT Data System 166, con unidades de salida TRC Tektronix 4010 e impresora Tektronix 4631 o en un espectrómetro Hewlett-Packard 5995, comandado por una computadora Hewlett-Packard 9825. En todos los casos los espectros se determinaron por introducción directa de la muestra en la fuente de iones.

Las mediciones de radiactividad se realizaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3003, o en un Tracor Analytic Mark III. Las muestras se disolvieron en una mezcla de 1 ml de agua y 14 ml de una solución centelladora de dioxano que contenía 100 g de naftaleno, 7,0 g de 2,5-difenil-oxazol (PPO) y 300 mg de 1,4-bis-2-(4-metil-5-fenil-oxazolil)-benceno (dimetil-POPOP) por cada 100 ml.

Las cromatografías gas-líquido (CGL) fueron realizadas en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5830 A con detector de ionización de llama, equipado con columnas de vidrio de 1,80 m de longitud y 2 mm de diámetro interno, que contenían como fase fija OV-17 3% sobre Chromosorb W-AW-DMCS (80-100).

Las cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) se realizaron en un cromatógrafo líquido Micromeritics modelo 750 con un detector de índice de refracción modelo 771 y equipado con una columna de fase inversa Altex Ultrasphere ODS 5 μ m (250 mm x 10 mm, d.i.). Los sistemas de solventes utilizados fueron metanol:agua (90:10) y metanol, a una velocidad de flujo de 3 ml/min.

Las cromatografías en capa delgada (CCD) se realizaron utilizando como fase fija sílicagel-G (Merck) y como revela-

dores vapores de yodo, ácido sulfúrico 50% en agua o la observación de la coloración a la luz ultravioleta de 254 nm, en las cromatografías analíticas. En las cromatografías preparativas (espesor 1 mm) se empleó sílicagel F 254.

Los sistemas de desarrollo utilizados fueron: 1) cloruro de metileno:metanol (95:5); 2) cloruro de metileno:acetona (65:35); 3) tolueno:acetato de etilo (70:30); 4) cloruro de metileno:metanol:agua (90:10:0,25); 5) cloruro de metileno:metanol (90:10) y 6) cloruro de metileno:metanol (93:7).

Las cromatografías en columna se realizaron utilizando como adsorbente sílicagel Davison (malla 100-200), alúmina Woelm (neutra) o sílicagel H Merck (malla 10-40), utilizando presión de aire.

La progesterona-(1, 2, 6, 7-³H) y la mevalonolactona-(2-¹⁴C) fueron adquiridas a The Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra.

El bromoacetato de etilo-(1-¹⁴C) fue proporcionado por la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Los solventes fueron evaporados a presión reducida por debajo de 50°C.

Material vegetal

Los primeros ensayos de extracción de glicósidos cardenólidos se realizaron con plantas Digitalis purpurea de más de un año de desarrollo, cultivadas en el INTA de Castelar, provincia de Buenos Aires y trasplantadas a un sector del vivero de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

Con el objeto de disponer de plantas de menor tiempo de desarrollo, se comenzó con el cultivo de las mismas a partir de semillas proporcionadas por el INTA.

Condiciones generales de germinación y desarrollo

El crecimiento de las plantas se realizó en una cámara de acrílico, con circulación forzada de aire. Su temperatura interna se reguló a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en el centro de la cámara, siendo la temperatura en el nivel inferior de 23°C .

Las plantas recibieron luz natural, suplementada con dos tubos fluorescentes Sylvania tipo Gro Lux, de 20W cada uno.

Se probaron distintas condiciones de germinación, sembrando las semillas sobre tierra, arena lavada y calcinada y vermiculita, encontrándose que los mejores resultados se obtenían cuando se preparaba un almácigo con tierra. Luego de 1 mes y medio de desarrollo las plantitas se transfirieron a recipientes individuales y fueron posteriormente utilizadas en los ensayos de administración de precursores radiactivos.

A. Síntesis de ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos y 23-norcol-20(22)(E)-énicos

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico (25)

A una solución de acetato de pregnenolona (24) (100 mg; 0,29 mmoles) en benceno anhidro (2,5 ml) se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno, zinc activado ⁶⁹ (150 mg; 2,30 mmoles) y algunos cristales de yodo. A la solución calentada y agitada se agregó, gota a gota, bromoacetato de etilo seco y recién destilado (0,3 ml). La reacción fue mantenida a reflujo por el agregado del reactivo. Una vez finalizado el mismo, se calentó a reflujo durante media hora más. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo. Se disgregó el sólido gomoso formado y se extrajo con éter etílico (3 x 20 ml).

La fase orgánica se lavó con agua (1 x 20 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 20 ml) y agua (1 x 20 ml); se secó y se evaporó el solvente.

El residuo se trató con anhídrido acético y piridina (1:1) (1,0 ml) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con éter etílico (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml); se secó y se evaporó el solvente.

El residuo (226 mg) se cromatografió en una columna de sílicagel G (10 g), utilizando como solventes de elución tolueno (200 ml) y tolueno:acetato de etilo (98:2) (300 ml). Se obtuvieron 118 mg (94%) del compuesto 25 cristalino, que se recrystalizó de metanol.

p.f.: 136-138°C (Metanol) (Lit. 30: 136-138°C (Metanol)).

I.R. (cm^{-1}): 3450 (tens. OH); 1730 (tens. C=O).

E.M. (m/e, %): 431 ($\text{M}^{+}-15$; 0,5); 386 ($\text{M}^{+}-60$; 25,8); 371 (386-15 ; 1,2); 368 (386-18 ; 2,4); 353 (368-15 ; 2,6); 341 (386-45 ; 3,8); 340 (386-46 ; 0,4); 265 (1,1); 255 (386-cadena lateral ; 1,8); 253 (3,3); 228 (1,4); 213 (4,5); 131 (cadena lateral ; 100); 85 (25,5).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,87 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19); 1,25 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OR); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,36 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OS); 2,03 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,38 (ba, 1H, OH); 4,19 (c, J: 7 Hz, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,58 (ba, 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,42 (Me-18 del isómero 2OS); 13,73 (Me-18 del isómero 2OR); 14,22 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 19,32 (Me-19); 20,89 (C-11); 21,37 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 22,74 (C-16 del isómero 2OS); 23,10 (C-16 del isómero 2OR); 23,80 (C-15); 26,82 (Me-21 del isómero 2OS); 26,96 (Me-21 del isómero 2OR); 27,75 (C-2); 31,33 (C-8); 31,75 (C-7); 36,58 (C-10); 36,97 (C-1); 38,09 (C-4); 40,03 (C-12); 42,76 (C-13 del isómero 2OS); 42,87 (C-13 del isómero 2OR); 45,89 (C-22 del isómero 2OR); 46,14 (C-22 del isómero 2OS); 49,93 (C-9); 56,68 (C-14 del isómero 2OR); 56,83 (C-14

del isómero 20S); 59,06 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ del isómero 20R); 59,26 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ del isómero 20S); 60,46 (C-17); 73,27 (C-20 del isómero 20S); 73,59 (C-20 del isómero 20R); 73,85 (C-3); 122,32 (C-6); 139,53 (C-5); 170,21 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 172,85 ($-\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$).

Separación de los ésteres etílicos de los ácidos 3β -acetoxi-20R-hidroxi-23-norcol-5-énico (25(20R)) y 3β -acetoxi-20S-hidroxi-23-norcol-5-énico (25(20S))

La mezcla 25(20R+20S) fue separada por CLAR, utilizando metanol:agua (90:10) como solvente. Por integración del área de cada pico del cromatograma se determinó la proporción de cada epímero en la mezcla, resultando el isómero 20S el componente mayoritario (62%).

Ambos epímeros fueron caracterizados mediante sus puntos de fusión y sus espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C :

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi-20R-hidroxi-23-norcol-5-énico (25(20R))

p.f.: 157-158°C (Metanol).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,88 (s, 3H, Me-18); 1,04 (s, 3H, Me-19); 1,28 (s, 3H, Me-21); 1,30 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,06 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,40 (ba, 1H, OH); 4,20 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,60 (ba, 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,69 (Me-18); 14,22 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 19,28 (Me-19); 20,85 (C-11); 21,33 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 23,13 (C-16); 23,81 (C-15); 26,92 (Me-21); 27,76 (C-2); 31,34 (C-8); 31,76 (C-7); 36,61 (C-10); 36,99 (C-1); 38,10 (C-4); 40,09 (C-12); 42,90 (C-13); 45,94 (C-22); 49,98 (C-9); 56,72 (C-14); 59,11 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 60,43 (C-17); 73,62 (C-20); 73,86 (C-3); 122,28 (C-6); 139,56 (C-5); 170,17 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 172,86 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-20S-hidroxi-23-norcol-5-
-énico (25(20S))

p.f.: 161-162°C (Metanol).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,88 (s, 3H, Me-18); 1,04 (s, 3H, Me-19); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,38 (s, 3H, Me-21); 2,04 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,45 (ba, 1H, OH); 4,18 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,60 (ba, 1H, H-3); 5,38 (m, 1H, H-6).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,42 (Me-18); 14,20 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 19,27 (Me-19); 20,89 (C-11); 21,38 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 22,72 (C-16); 23,79 (C-15); 26,80 (Me-21); 27,75 (C-2); 31,31 (C-8); 31,71 (C-7); 36,55 (C-10); 36,97 (C-1); 38,07 (C-4); 40,02 (C-12); 42,73 (C-13); 46,13 (C-22); 49,88 (C-9); 56,79 (C-14); 59,24 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 60,45 (C-17); 73,26 (C-20); 73,84 (C-3); 122,30 (C-6); 139,50 (C-5); 170,21 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 172,80 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-

-5-énico-24-¹⁴C (25-¹⁴C)

A una solución de acetato de pregnenolona (24) (41 mg; 0,12 mmoles) en benceno anhidro (1 ml) se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno, zinc activado ⁶⁹ (61 mg; 0,94 mmoles) y algunos cristales de yodo. A la solución calentada y agitada se agregó, gota a gota, bromoacetato de etilo-(1-¹⁴C) (1,08 mCi/mmol) (0,1 ml). La reacción fue mantenida a reflujo por el agregado del reactivo. Una vez finalizado el mismo, se calentó a reflujo durante media hora más. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo. Se disgregó el sólido formado y se extrajo con éter etílico (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml); se secó y se evaporó el solvente.

El residuo se trató con anhídrido acético y piridina (1:1) (0,4 ml) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con éter etílico (3 x 5 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 5 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 5 ml) y agua (1 x 5 ml); se secó y se evaporó el solvente.

El residuo (92 mg) se cromatografió en una columna de sílicagel G (4 g), utilizando tolueno (100 ml) y tolueno:acetato de etilo (98:2) (100 ml) como solventes de elución. Se obtuvieron 48 mg (94%) del compuesto 25-¹⁴C cristalino, que se recristalizó de metanol hasta actividad específica constante (1,1 mCi/mmol).

Acido 3β ,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico (17)

El éster etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico (25) (154 mg; 0,35 mmoles) se disolvió en metanol (2 ml) y se le agregó una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,3 ml). La solución resultante fue calentada a reflujo durante 3 horas, al cabo de las cuales se evaporó el metanol y se diluyó con agua (5 ml). Se extrajo con éter etílico (2 x 5 ml) para eliminar restos de pregnenolona. Por acidificación con ácido clorhídrico 2N (1 ml) de la fase acuosa extraída precipitó un sólido. La mezcla fue extraída con éter etílico (3 x 5 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 5 ml) hasta neutralidad, se secó y se evaporó el solvente, obteniéndose 104 mg (80%) del compuesto 17 cristalino, que se recrystalizó de acetona.

p.f.: 202-208°C (Acetona) (Lit. 70: 204-206°C (Acetona)).

I.R. (cm^{-1}): 3500-2500 (tens. OH); 1700 (tens. C=O).

E.M. (m/e, %): 376 (M^{+} ; 10,0); 358 (M^{+} -18 ; 78,0); 343 (358-15 ; 28,0) ; 340 (358-18 ; 57,0); 325 (340-15 ; 52,0); 316 (358-42 ; 5,0); 314 (23,0); 298 (358-60 ; 20,0); 273 (M^{+} -cadena lateral ; 8,0); 265 (7,0); 256 (82,0); 255 (358-cadena lateral ; 8,0); 246 (12,0); 233 (8,0); 232 (20,0); 231 (38,0); 228 (16,0); 227 (13,0); 214 (30,0); 213 (84,0); 103 (cadena lateral ; 100,0); 85 (53,0).

RMN- ^1H (Piridina- d_5) ppm: 1,06 (s, 3H, Me-18); 1,12 (s, 3H, Me-19); 1,60 (s, 3H, Me-21 del isómero 20R); 1,78 (s, 3H, Me-21

del isómero 20S); 2,86 (s, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2\text{CO}_2\text{H}$); 3,84 (ba, 1H, H-3); 5,44 (m, 1H, H-6).

RMN- ^{13}C (Piridina- d_5) ppm: 13,81 (Me-18 del isómero 20S); 14,00 (Me-18 del isómero 20R); 19,60 (Me-19); 21,25 (C-11); 23,12 (C-16 del isómero 20S); 23,33 (C-16 del isómero 20R); 24,18 (C-15); 27,62 (Me-21 del isómero 20S); 28,07 (Me-21 del isómero 20R); 31,62 (C-8); 32,09 (C-7); 32,51 (C-2); 36,87 (C-10); 37,78 (C-1); 40,38 (C-12); 43,00 (C-13 del isómero 20S); 43,10 (C-13 del isómero 20R); 43,37 (C-4); 46,80 (C-22 del isómero 20R); 48,01 (C-22 del isómero 20S); 50,41 (C-9); 57,02 (C-14); 59,15 (C-17); 71,17 (C-3); 73,17 (C-20 del isómero 20S); 73,33 (C-20 del isómero 20R); 121,03 (C-6); 141,72 (C-5); 175,39 ($-\underline{\text{CO}}_2\text{H}$ del isómero 20R); 175,56 ($-\underline{\text{CO}}_2\text{H}$ del isómero 20S).

Acido 3β ,20S-dihidroxi-23-norcol-5-énico (17(20S))

Se disolvió el éster etílico del ácido 3β -acetoxi-20S-hidroxi-23-norcol-5-énico (25(20S)) (37 mg; 0,08 mmoles) en metanol (0,5 ml) y se le agregó una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,1 ml). La solución resultante se calentó a reflujo durante 3 horas, al cabo de las cuales se evaporó el metanol y se diluyó con agua (2 ml). Por acidificación con ácido clorhídrico 2N (0,5 ml) precipitó un sólido. La mezcla fue extraída con éter etílico (3 x 5 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 5 ml) hasta neutralidad, se secó y se evaporó el solvente, obteniéndose 26 mg (79%) del compuesto 17(20S), que

se recrystalizó de acetona.

p.f.: 184-185°C (Acetona).

RMN-¹H (Piridina-d₅) ppm: 1,05 (s, 3H, Me-18); 1,12 (s, 3H, Me-19); 1,78 (s, 3H, Me-21); 2,87 (s, 2H, -CH₂CO₂H); 3,84 (ba, 1H, H-3); 5,45 (m, 1H, H-6).

RMN-¹³C (Piridina-d₅) ppm: 13,73 (Me-18); 19,52 (Me-19); 21,25 (C-11); 23,12 (C-16); 24,13 (C-15); 27,59 (Me-21); 31,57 (C-8); 32,02 (C-7); 32,50 (C-2); 36,81 (C-10); 37,73 (C-1); 40,35 (C-12); 43,00 (C-13); 43,35 (C-4); 48,04 (C-22); 50,35 (C-9); 57,09 (C-14); 59,20 (C-17); 71,11 (C-3); 73,11 (C-20); 121,00 (C-6); 141,71 (C-5); 175,50 (-CO₂H).

Acido 3β,20(R,S)-dihidroxi-23-norcol-5-énico-24-¹⁴C (17-¹⁴C)

Se disolvió el éster etílico del ácido 3β-acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24-¹⁴C (25-¹⁴C) (46 mg; 0,10 mmoles) en metanol (0,6 ml) y se le agregó una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,1 ml). La solución fue calentada a reflujo durante 3 horas, al cabo de las cuales se evaporó el metanol y se diluyó con agua (2 ml). Se extrajo con éter etílico para eliminar restos de pregnenolona y por acidificación con ácido clorhídrico 2N (0,5 ml) de la fase acuosa remanente, precipitó un sólido. La mezcla fue extraída con éter etílico (3 x 5 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 5 ml) hasta neutralidad, se secó y se evaporó el solvente, obteniéndose

31 mg (81%) del compuesto 17- ^{14}C , que se recrystalizó de acetona hasta actividad específica constante (1,17 mCi/mmol).

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)(E)-dienico (26a)

El éster etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico (25) (165 mg; 0,37 mmoles) se disolvió en piridina anhidra (2,0 ml), se agregó lentamente oxiclورو de fósforo (0,3 ml) y la mezcla se dejó en reposo durante 22 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con clورو de metileno (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (154 mg) se cromatografió en una columna de alúmina (7 g), utilizando tolueno (200 ml) como solvente de elución. Se obtuvieron 110 mg de un producto crudo que resultó ser, por análisis por RMN- ^1H , una mezcla de cuatro compuestos.

Dicha mezcla fue recrystalizada 2 veces de etanol, obteniéndose 36 mg (23%) del compuesto 26a, homogéneo por CGL.

p.f.: 140-143°C (Etanol) (Lit. 30: 140-142°C (Etanol)).

I.R. (cm^{-1}): 1735 (tens. C=O del acetato); 1700 (tens. C=O del éster etílico); 1625 (tens. C=C); 870 (def. C=C-H).

E.M. (m/e, %): 428 (M^{+} ; 0,2); 413 ($\text{M}^{+}-15$; 0,2); 383 ($\text{M}^{+}-45$;

7,0); 368 (M^{+} -60 ; 100,0); 353 (413-60 ; 20,0); 323 (368-45 ; 4,0); 322 (368-46 ; 7,0); 307 (322-15 ; 20,0); 279 (10,0); 253 (10,0); 228 (16,0); 227 (10,0); 214 (20,0); 213 (65,0); 212 (10,0).

RMN- 1H (Cl_3CD) ppm: 0,63 (s, 3H, Me-18); 1,00 (s, 3H, Me-19); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-CO_2CH_2CH_3$); 2,05 (s, 3H, $-CO_2CH_3$); 2,21 (d, J: 1,5 Hz, 3H, Me-21); 4,18 (c, J: 7 Hz, 2H, $-CO_2CH_2CH_3$); 4,61 (ba, 1H, H-3); 5,41 (ba, 1H, H-6); 5,68 (ba, 1H, H-22).
RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 12,96 (Me-18), 14,35 ($-CO_2CH_2CH_3$); 19,34 (Me-19); 20,65 (Me-21); 21,01 (C-11); 21,39 ($-CO_2CH_3$); 24,30 (C-16); 24,94 (C-15); 27,75 (C-2); 31,72 (C-8); 32,14 (C-7); 36,62 (C-10); 36,99 (C-1); 38,09 (C-4); 38,47 (C-12); 44,47 (C-13); 50,09 (C-9); 56,53 (C-14); 59,38 ($-CO_2CH_2CH_3$); 60,33 (C-17); 73,81 (C-3); 115,91 (C-22); 122,21 (C-6); 139,56 (C-5); 159,70 (C-20); 166,80 ($-CO_2CH_2CH_3$); 170,29 ($-CO_2CH_3$).

Separación de los ésteres etílicos de los ácidos 3β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (26a), 3β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)(Z)-diénico (26b), 3β -acetoxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (26c) y 3β -acetoxi-23-norcola-5,20-diénico (26d)

La mezcla de isómeros correspondientes a las aguas madres de la recristalización del producto de la reacción del compuesto 25 con oxicloruro de fósforo en piridina fue separada por CLAR, utilizando metanol como solvente. Se caracterizó cada isómero mediante su espectro de RMN- 1H .

Por integración de las áreas de cada uno de los picos del cromatograma se determinó la composición porcentual de la mezcla: isómero E (26a), 30%; isómero Z (26b), 20%; isómero $\Delta^{17, 20}$ (26c), 22%; isómero Δ^{20} (26d), 28%.

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)(Z)-diénico (26b)

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,69 (s, 3H, Me-18); 1,00 (s, 3H, Me-19); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,05 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 1,90 (d, J: 1,5 Hz, 3H, Me-21); 4,17 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,60 (ba, 1H, H-3); 5,40 (ba, 1H, H-6); 5,78 (m, 1H, H-22).

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (26c)

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,75 (s, 3H, Me-18); 1,01 (s, 3H, Me-19); 1,24 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,76 (t, J: 1,7 Hz, 3H, Me-21); 2,04 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2,90 (ba, 2H, H-22); 4,16 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,60 (ba, 1H, H-3); 5,40 (ba, 1H, H-6).

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20-diénico (26d)

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,61 (s, 3H, Me-18), 1,00 (s, 3H, Me-19);

1,27 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,04 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,03 (s, 2H, H-22); 4,14 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,60 (ba, 1H, H-3); 4,96 (d, J: 1,8 Hz, 2H, H-21); 5,40 (ba, 1H, H-6).

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)(E)-di-énico-24- ^{14}C (26a- ^{14}C)

El éster etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C (25- ^{14}C) (act. específica: 1,1 mCi/mmol) (150 mg; 0,34 mmoles) se disolvió en piridina anhidra (1,8 ml) y se agregó lentamente oxiclورو de fósforo (0,3 ml). La mezcla se dejó en reposo durante 22 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 10 ml).

La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (145 mg) se cromatografió en una columna de alúmina (6 g), utilizando tolueno (200 ml) como solvente de elución. Se obtuvieron 117 mg de un producto crudo que resultó ser, por análisis de su espectro de RMN- ^1H , una mezcla de cuatro isómeros.

La mezcla fue separada por CLAR, utilizando metanol como solvente. Se obtuvieron 64 mg (45%) del compuesto 26a- ^{14}C , el que se recrystalizó de etanol hasta actividad específica constante (1,0 mCi/mmol).

Acido 3 β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (21)

A una solución del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (26a) (165 mg; 0,39 mmoles) en etanol (4,6 ml) se le agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio 50% (0,70 ml) y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (0,7 ml) y la suspensión resultante se volcó sobre agua (5 ml), se refrigeró y se filtró el precipitado formado, obteniéndose 124 mg (90%) del compuesto 21 cristalino, que se recrystalizó de etanol.

p.f.: 263-265°C (Etanol) (Lit. 70: 262-265°C (Etanol)).

I.R. (cm⁻¹): 3300 (tens. del OH del alcohol); 3200-2300 (tens. del OH del ácido); 1670 (tens. C=O); 1620 (tens. C=C); 1050 (tens. C-O).

E.M. (m/e, %): 358 (M⁺• ; 45,3); 343 (M⁺•-15 ; 7,3); 340 (M⁺•-18 ; 63,0); 313 (M⁺•-45 ; 3,9); 308 (343-45 ; 21,5); 299 (10,5); 298 (4,0); 295 (340-45 ; 1,6); 274 (2,1); 273 (M⁺•-cadena lateral; 1,7); 258 (343-cadena lateral ; 2,2); 255 (340-cadena lateral ; 1,7); 247 (3,1); 245 (3,9); 244 (1,9); 240 (258-18 ; 2,8); 233 (11,3); 232 (26,9); 231 (5,2); 218 (4,2); 215 (11,6); 214 (22,8); 213 (100,0); 203 (2,3); 85 (cadena lateral ; 3,1).

RMN-¹H (Piridina-d₅) ppm: 0,62 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19); 2,42 (d, J: 1 Hz, 3H, Me-21); 3,83 (ba, 1H, H-3); 5,40 (m, 1H, H-6); 6,15 (m, 1H, H-22).

RMN-¹³C (Piridina-d₅) ppm: 12,99 (Me-18); 19,56 (Me-19); 20,71 (Me-21); 21,32 (C-11); 24,49 (C-16); 25,14 (C-15); 32,03 (C-8);

32,35 (C-7); 32,55 (C-2); 36,88 (C-10); 37,77 (C-1); 38,66 (C-12); 43,40 (C-4); 44,47 (C-13); 50,48 (C-9); 56,54 (C-14); 60,33 (C-17); 71,17 (C-3); 117,92 (C-22); 120,88 (C-6); 141,83 (C-5); 158,16 (C-20); 169,17 ($-\text{CO}_2\text{H}$).

Acido 3β -hidroxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-24- ^{14}C ($^{21-14}\text{C}$)

A una solución del éster etílico del ácido 3β -acetoxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-24- ^{14}C ($^{26a-14}\text{C}$) (act. específica: 1,0 mCi/mmol) (31 mg; 0,07 mmoles) en etanol (0,9 ml) se le agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio 50% (0,13 ml) y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (0,13 ml) y la suspensión resultante se volcó sobre agua (2 ml), se refrigeró y se filtró el precipitado formado, obteniéndose 23 mg (90%) del compuesto $^{21-14}\text{C}$ cristalino, que se recrystalizó de etanol hasta actividad específica constante (1,0 mCi/mmol).

3,3;20,20-dietilendioxi-progesterona (30)

A una solución de progesterona (29) (5 g; 0,02 moles) en tolueno (175 ml) se agregó etilenglicol (40 ml). La mezcla fue destilada durante 15 minutos para remover trazas de agua. Luego de agregar ácido p-toluensulfónico monohidrato (163 mg) la mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas, con una trampa de

Dean Stark para separar el agua formada durante la reacción.

A continuación, se enfrió, se agregó una solución saturada de bicarbonato de sodio (50 ml) y se separó la fase orgánica, que se lavó con agua (2 x 30 ml), se secó y se evaporó el solvente. Se obtuvieron 6g (94%) del compuesto 30 cristalino, que se recrystalizó de acetona.

p.f.: 180-182°C (Acetóna) (Lit. 71: 180-182°C (Acetona)).

I.R. (cm^{-1}): 1098 (cetal en C-3); 1055 (cetal en C-20).

E.M. (m/e, %): 402 (M^{+} ; 18,8); 387 ($\text{M}^{+}-15$; 5,2); 303 ($\text{M}^{+}-\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_7$; 0,4); 125 ($\text{C}_7\text{O}_2\text{H}_9$; 0,5); 112 ($\text{C}_6\text{O}_2\text{H}_8$; 0,4); 99 ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_7$; 100,0); 87 (cadena lateral ; 99,8).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,72 (s, 3H, Me-18); 1,00 (s, 3H, Me-19); 1,20 (s, 3H, Me-21); 3,80 (s, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 5,2 (m, 1H, H-6).
RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 12,89 (Me-18); 18,89 (Me-19); 20,85 (C-11); 23,01 (C-16); 23,85 (C-15); 24,54 (Me-21); 31,07 (C-2); 31,45 (C-7); 31,65 (C-8); 36,30 (C-1); 36,65 (C-10); 39,40 (C-12); 41,77 (C-4 y C-13); 49,67 (C-9); 56,56 (C-14); 63,16 (C-17); 64,15 y 64,35 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ de C-3); 65,09 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ de C-20); 109,40 (C-3); 111,80 (C-20); 121,92 (C-6); 140,01 (C-5).

3,3-etilendioxi-progesterona (31)

A una solución de 3,3;20,20-dietilendioxi-progesterona (30) (1g; 2,5 moles) en acetona (100 ml) se agregó ácido p-toluen-sulfónico monohidrato (60 mg) y la mezcla se mantuvo a tempera-

tura ambiente durante media hora. Se agregó piridina (1 ml) y se evaporó el solvente. El residuo obtenido fue tratado con una solución de bicarbonato de sodio 30% (100 ml). Se obtuvo un sólido cristalino (0,7 g) (79%), que luego de filtrado y secado fue recrystalizado de metanol.

p.f.: 173-176°C (Metanol) (Lit. 39: 173-175°C (Acetona-hexano)).

I.R. (cm^{-1}): 1706 (tens. C=O); 1098 (tens. C-O-C).

E.M. (m/e, %): 358 (M^{+} ; 11,7); 342 ($\text{M}^{+}-15$; 0,1); 315 (M^{+} -cadena lateral ; 0,4); 259 ($\text{M}^{+}-\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_7$; 0,1); 125 ($\text{C}_7\text{O}_2\text{H}_9$; 0,4); 112 ($\text{C}_6\text{O}_2\text{H}_8$; 0,1); 99 ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_7$; 100,0); 43 (cadena lateral ; 13,8).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,64 (s, 3H, Me-18); 1,02 (s, 3H, Me-19); 2,1 (s, 3H, Me-21); 3,93 (s, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 5,30 (ba, 1H, H-6).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,21 (Me-18); 18,86 (Me-19); 21,05 (C-11); 22,83 (C-16); 24,47 (C-15); 31,03 (C-2); 31,62 (C-7 y Me-21); 31,85 (C-8); 36,30 (C-1); 36,61 (C-10); 38,81 (C-12); 41,71 (C-4); 43,94 (C-13); 49,54 (C-9); 56,85 (C-14); 63,60 (C-17); 64,15 y 64,36 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 109,34 (C-3); 121,73 (C-6); 139,98 (C-5); 209,14 (C-20).

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxo-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico (32)

A una solución de 3,3-etilendioxo-progesterona (31) (260 mg; 0,58 mmoles) en benceno anhidro (2 ml) se agregó, bajo at-

mósfera de nitrógeno, zinc activado ⁶⁹ (391 mg; 6,0 mmoles) y algunos cristales de iodo. A la solución calentada y agitada se agregó, gota a gota, bromoacetato de etilo seco y recién destilado (0,7 ml). La reacción fue mantenida a reflujo por el agregado del reactivo. Una vez finalizado el mismo, se calentó a reflujo durante media hora más. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo. Se disgregó el sólido formado y se extrajo con éter etílico (3 x 25 ml).

La fase orgánica se lavó con agua (1 x 20 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 20 ml) y agua (1 x 20 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (650 mg) se cromatografió en una columna de sílicagel G (30 g), utilizando como solventes de elución tolueno (150 ml), tolueno:acetato de etilo (98:2) (350 ml) y tolueno:acetato de etilo (95:5) (400 ml). Se obtuvieron 255 mg (70%) del compuesto 32 cristalino, que se recrystalizó de metanol.

p.f.: 165-166°C (Metanol) (Lit. 39: 205-207°C).

I.R. (cm⁻¹): 3610 (tens. OH); 1730 (tens. C=O); 1098 (tens. C-O-C).

E.M. (m/e, %): 446 (M⁺ ; 0,7); 431 (M⁺-15 ; 0,2); 401 (M⁺-45 ; 0,2); 400 (M⁺-46 ; 0,4); 131 (cadena lateral ; 2,6); 125 (C₇O₂H₉ ; 0,7); 99 (C₅O₂H₇ ; 100,0); 86 (1,5).

RMN-¹H (Cl₃CD) ppm: 0,86 (s, 3H, Me-18); 1,02 (s, 3H, Me-19);

1,20 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OR); 1,26 (t, J: 7 Hz, 3H, -CO₂-CH₂CH₃); 1,34 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OS); 3,34 (ba, 1H, OH);

3,92 (s, 4H, -OCH₂CH₂O-); 4,20 (c, J: 7 Hz, 2H, -CO₂CH₂CH₃); 5,30 (ba, 1H, H-6).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,42 (Me-18 del isómero 2OS); 13,73 (Me-18 del isómero 2OR); 14,21 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 18,86 (Me-19); 20,89 (C-11); 22,73 (C-16 del isómero 2OS); 23,06 (C-16 del isómero 2OR); 23,80 (C-15); 26,81 (Me-21); 31,06 (C-2); 31,34 (C-7); 31,60 (C-8); 36,29 (C-1); 36,60 (C-10); 40,07 (C-12); 41,76 (C-4); 42,77 (C-13); 45,88 (C-22 del isómero 2OR); 46,10 (C-22 del isómero 2OS); 49,56 (C-9); 56,84 (C-14); 59,05 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ del isómero 2OR); 59,21 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ del isómero 2OS); 60,47 (C-17); 64,15 y 64,36 ($-\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{O}-$); 73,29 (C-20 del isómero 2OS); 73,64 (C-20 del isómero 2OR); 109,32 (C-3); 121,89 (C-6); 139,99 (C-5); 172,91 ($-\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$).

Separación de los ésteres etílicos de los ácidos 3,3-etilendioxi-2OR-hidroxi-23-norcol-5-énico (32(2OR)) y 3,3-etilendioxi-2OS-hidroxi-23-norcol-5-énico (32(2OS))

Se separó la mezcla de los epímeros 2OR y 2OS mediante CLAR, utilizando metanol:agua (90:10) como solvente.

Se determinó la proporción de cada epímero en la mezcla mediante la integración del área de cada pico del cromatograma. Se encontró que el isómero 2OS es el componente mayoritario (62%).

Se caracterizó cada epímero por su punto de fusión y sus espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C .

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxi-2OR-hidroxi-23-norcol-5-énico (32(2OR))

p.f.: 142-143°C (Metanol).

RMN-¹H (Cl₃CD) ppm: 0,87 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19); 1,20 (s, 3H, Me-21); 1,27 (t, J: 7 Hz, 3H, -CO₂CH₂CH₃); 3,34 (ba, 1H, OH); 3,92 (s, 4H, -OCH₂CH₂O-); 4,20 (c, J: 7 Hz, 2H, -CO₂CH₂CH₃); 5,30 (ba, 1H, H-6).

RMN-¹³C (Cl₃CD) ppm: 13,73 (Me-18); 14,20 (-CO₂CH₂CH₃); 18,85 (Me-19); 20,89 (C-11); 23,06 (C-16); 23,81 (C-15); 26,80 (Me-21); 31,07 (C-2); 31,34 (C-7); 31,60 (C-8); 36,29 (C-1); 36,60 (C-10); 40,08 (C-12); 41,76 (C-4); 42,78 (C-13); 45,89 (C-22); 49,55 (C-9); 56,84 (C-14); 59,05 (-CO₂CH₂CH₃); 60,47 (C-17); 64,35 y 64,15 (-OCH₂CH₂O-); 73,64 (C-20); 109,30 (C-3); 121,90 (C-6); 140,00 (C-5); 172,90 (-CO₂CH₂CH₃).

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxi-20S-hidroxi-23-norcol-5-énico (32(20S))

p.f.: 185-186°C (Metanol).

RMN-¹H (Cl₃CD) ppm: 0,87 (s, 3H, Me-18); 1,03 (s, 3H, Me-19); 1,27 (t, J: 7 Hz, 3H, -CO₂CH₂CH₃); 1,34 (s, 3H, Me-21); 3,35 (ba, 1H, OH); 3,93 (s, 4H, -OCH₂CH₂O-); 4,20 (c, J: 7 Hz, 2H, -CO₂CH₂CH₃); 5,30 (ba, 1H, H-6).

RMN-¹³C (Cl₃CD) ppm: 13,42 (Me-18); 14,19 (-CO₂CH₂CH₃); 18,87 (Me-19); 20,90 (C-11); 22,72 (C-16); 23,79 (C-15); 26,85 (Me-21); 31,08 (C-2); 31,34 (C-7); 31,58 (C-8); 36,25 (C-1); 36,58 (C-10); 40,10 (C-12); 41,78 (C-4); 42,77 (C-13); 46,10 (C-22); 49,54 (C-9); 56,80 (C-14); 59,20 (-CO₂CH₂CH₃); 60,46 (C-17); 64,30 y

y 64,20 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 73,30 (C-20); 109,22 (C-3); 121,84 (C-6); 139,98 (C-5); 172,91 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C (32- ^{14}C)

A una solución de 3,3-etilendioxi-progesterona (31) (260 mg; 0,58 mmoles) en benceno anhidro (2 ml) se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno, zinc activado (391 mg; 6,0 mmoles) y algunos cristales de iodo. A la solución calentada y agitada se agregó, gota a gota, bromoacetato de etilo-(1- ^{14}C) (act. específica: 0,99 mCi/mmol) (0,7 ml). La reacción fue mantenida a refujo por el agregado del reactivo. Una vez finalizado el mismo, se calentó a reflujo durante media hora. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo. Se disgregó el sólido formado y se extrajo con éter etílico (3 x 25 ml).

La fase orgánica se lavó con agua (1 x 20 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 20 ml) y agua (1 x 20 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (650 mg) se cromatografió en una columna de sílicagel G (30 g), utilizando como solventes de elución tolueno (150 ml), tolueno:acetato de etilo (98:2) (350 ml) y tolueno:acetato de etilo (95:5) (400 ml). Se obtuvieron 255 mg (70%) del compuesto 32- ^{14}C , que se recristalizó de metanol hasta actividad específica constante (1,00 mCi/mmol).

Ester etílico del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-
-énico (33)

Una solución del éster etílico del ácido 3,3-etilendioxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico (32) (80 mg; 0,18 mmoles) en acetona (3,6 ml) fue tratada con ácido p-toluensulfónico (18 mg) a temperatura ambiente durante 2 días. Una vez finalizada la reacción, se evaporó la acetona, se suspendió el residuo en una solución saturada de bicarbonato de sodio (5,5 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). La fase orgánica fue lavada con agua (2 x 5 ml), secada y evaporado el solvente. Se obtuvo un aceite amarillento (61,5 mg), que se cromatografió en una columna de sílicagel G (3 g). Se eluyó con tolueno (100 ml) y tolueno:acetato de etilo (98:2) (300 ml), aislándose 58 mg (80%) del compuesto 33 cristalino, que se recristalizó de etanol.

p.f.: 127-128°C (Etanol).

I.R. (cm^{-1}): 3100-3500 (tens. OH); 1750 (tens. C=O del éster); 1690 (tens. C=O de la cetona); 1640 (tens. C=C).

E.M. (m/e, %): 402 (M^{+} ; 0,1); 387 (M^{+} -15 ; 0,6); 384 (M^{+} -18 ; 0,4); 369 (387-18 ; 0,2); 357 (M^{+} -45 ; 0,9); 229 (M^{+} -cadena lateral- $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$; 7,7); 149 (M^{+} -cadena lateral- C_8OH_{10} ; 15,9); 131 (cadena lateral ; 100,0); 124 (C_8OH_{12} ; 37,2); 85 (25,6).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,90 (s, 3H, Me-18); 1,20 (s, 6H, Me-19 y Me-21 del isómero 20R); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,36 (s, 3H, Me-21 del isómero 20S); 3,46 (s, 1H, OH); 4,18 (c, J: 7 Hz,

2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,74 (ba, 1H, H-4).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,43 (Me-18 del isómero 2OS); 13,73 (Me-18 del isómero 2OR); 14,17 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 17,33 (Me-19); 20,85 (C-11); 22,60 (C-16 del isómero 2OS); 22,97 (C-16 del isómero 2OR); 23,65 (C-15); 26,81 (Me-21); 31,85 (C-7); 32,82 (C-6); 33,87 (C-2); 34,93 (C-8); 35,62 (C-1); 38,50 (C-10); 39,88 (C-12); 42,77 (C-13); 45,78 (C-22 del isómero 2OR); 46,05 (C-22 del isómero 2OS); 53,63 (C-9); 55,95 (C-14); 59,06 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 60,41 (C-17); 73,07 (C-20); 123,55 (C-4); 171,06 (C-5); 172,75 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 199,00 (C-3).

Ester etílico del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-
-énico-24- ^{14}C (33- ^{14}C)

Una solución del éster etílico del ácido 3,3-etilendioxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C (32- ^{14}C) (act. específica: 1,00 mCi/mmol) (99 mg; 0,22 mmoles) en acetona (4,5 ml) fue tratada con ácido p-toluensulfónico (23 mg) a temperatura ambiente durante 2 días. Una vez finalizada la reacción, se evaporó la acetona, se suspendió el residuo en una solución saturada de bicarbonato de sodio (6,8 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml). La fase orgánica fue lavada con agua (1 x 10 ml), secada y evaporado el solvente. Se obtuvo un aceite amarillo (90,0 mg), que se cromatografió en una columna de sílica-gel G (4,5 g) y se eluyó con tolueno (100 ml) y tolueno:acetato de etilo (98:2) (400 ml), aislándose 78 mg (87%) del compuesto

33-¹⁴C, que se recrystalizó de etanol hasta actividad específica constante (1,02 mCi/mmol).

Acido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico (18)

Una solución del éster etílico del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico (33) (78 mg; 0,19 mmoles) en metanol (2 ml) fue tratada con una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,2 ml), calentando a reflujo durante 3 horas. Se evaporó el metanol y se agregó agua (5 ml). Se extrajo con éter etílico (2 x 5 ml) para eliminar restos del producto de partida. Por acidificación con ácido clorhídrico 2N (0,5 ml) de la fase acuosa remanente, precipitó un sólido. La mezcla fue extraída con éter etílico (3 x 10 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 10 ml) hasta neutralidad, se secó y se evaporó el solvente, obteniéndose 63,3 mg de un aceite naranja, el que se cromatografió en una columna de sílicagel G (3 g). Se eluyó con cloruro de metileno (100 ml) y cloruro de metileno:metanol (99:1) (200 ml), aislándose 43 mg (60%) del compuesto 18 cristalino, que se recrystalizó de etanol.

p.f.: 192-194°C (Etanol).

I.R. (cm⁻¹): 3300-3600 (tens. OH); 1750 (tens. C=O); 1660 (tens. C=C).

E.M. (m/e, %): 359 (M⁺-15 ; 1,3); 341 (359-18 ; 1,8); 314 (M⁺-18-CH₂=C=O ; 18,5); 271 (M⁺-cadena lateral ; 1,8); 256 (271-15 ;

1,8); 232 ($M^{+} - 18 - C_8OH_{12}$; 11,2); 229 ($271 - CH_2=C=O$; 2,6); 202 ($271 - C_4CH_5$; 4,1); 149 ($271 - C_8OH_{10}$; 12,2); 124 (C_8OH_{12} ; 36,5); 103 (cadena lateral ; 100,0); 85 (32,6).

RMN- 1H (Piridina- d_5) ppm: 1,04 (s, 3H, Me-18) 1,12 (s, 3H, Me-19); 1,62 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OR); 1,78 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OS); 2,88 (m, 2H, CH_2CO_2H); 5,88 (ba, 1H, H-4).

RMN- ^{13}C (Piridina- d_5) ppm: 13,83 (Me-18 del isómero 2OS); 14,02 (Me-18 del isómero 2OR); 17,09 (Me-19); 21,04 (C-11); 23,02 (C-16 del isómero 2OS); 23,22 (C-16 del isómero 2OR); 23,98 (C-15); 27,56 (Me-21 del isómero 2OS); 27,99 (Me-21 del isómero 2OR); 32,11 (C-7); 32,78 (C-6); 34,26 (C-2); 34,93 (C-8); 35,78 (C-1); 38,57 (C-10); 40,19 (C-12); 43,00 (C-13 del isómero 2OS); 43,10 (C-13 del isómero 2OR); 46,70 (C-22 del isómero 2OR); 47,88 (C-22 del isómero 2OS); 53,80 (C-9); 56,08 (C-14 del isómero 2OR); 56,17 (C-14 del isómero 2OS); 58,90 (C-17); 73,02 (C-20 del isómero 2OS); 73,19 (C-20 del isómero 2OR); 123,80 (C-4); 170,50 (C-5); 175,29 ($-CO_2H$ del isómero 2OR); 175,44 ($-CO_2H$ del isómero 2OS).

Acido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C (18- ^{14}C)

Una solución del éster etílico del ácido 3-ceto-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-4-énico-24- ^{14}C (33- ^{14}C) (act. específica: 1,02 mCi/mmol) (78 mg; 0,19 mmoles) en metanol (2 ml) fue tratada con una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,2 ml), calentando a reflujo durante 3 horas. Se evaporó el metanol

y se agregó agua (5 ml). Se extrajo con éter etílico (2 x 5 ml) para eliminar restos del producto de partida. Por acidificación con ácido clorhídrico 2N (0,5 ml) de la fase acuosa remanente, precipitó un sólido. La mezcla fue extraída con éter etílico (3 x 10 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 10 ml) hasta neutralidad, se secó y se evaporó el solvente, obteniéndose 63,3 mg de un aceite naranja, el que se cromatografió en una columna de sílicagel G (3 g). Se eluyó con cloruro de metileno (100 ml) y cloruro de metileno:metanol (99:1) (22 ml), aislándose 43 mg (60%) del compuesto $18-^{14}\text{C}$ cristalino, que se recrystalizó de etanol hasta actividad específica constante (1,05 mCi/mmol).

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (34a)

El éster etílico del ácido 3,3-etilendioxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico (32) (250 mg; 0,56 mmoles) se disolvió en piridina anhidra (3,2 ml), se agregó lentamente oxiclورو de fósforo (0,6 ml) y la mezcla se dejó en reposo durante 22 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 30 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 20 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 20 ml) y agua (1 x 20 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (240 mg) se cromatografió en una columna de alúmina (11 g), u-

utilizando tolueno (300 ml) como solvente de elución. Se obtuvieron 236 mg (98%) de un producto crudo que resultó ser, por análisis por RMN- ^1H , una mezcla de cuatro compuestos. Dicha mezcla fue recristalizada 2 veces de etanol, obteniéndose 75 mg (31%) del compuesto 34a cristalino, homogéneo por CGL.

p.f.: 164-166°C (Etanol).

I.R. (cm^{-1}): 1700 (tens. C=O); 1630 (tens. C=C); 1098 (tens. C-O-C).

E.M. (m/e, %): 428 (M^{+} ; 29,3); 413 ($\text{M}^{+}-15$; 1,7); 383 ($\text{M}^{+}-45$; 0,6); 382 ($\text{M}^{+}-46$; 0,3); 367 (413-46 ; 2,2); 125 ($\text{C}_7\text{O}_2\text{H}_9$; 2,2); 113 (cadena lateral ; 6,5); 112 ($\text{C}_6\text{O}_2\text{H}_8$; 2,0); 100 (77,9); 99 ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_7$; 100,0); 67 (20,1).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,60 (s, 3H, Me-18); 1,04 (s, 3H, Me-19); 1,28 (t, J: 7 Hz, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,20 (d, J: 1Hz, 3H, Me-21); 3,96 (s, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 4,16 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,36 (m, 1H, H-6); 5,70 (ba, 1H, H-22).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,02 (Me-18); 14,44 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 18,93 (Me-19); 20,71 (Me-21); 21,07 (C-11); 24,37 (C-16); 24,98 (C-15); 31,09 (C-2); 31,66 (C-7); 32,20 (C-8); 36,35 (C-1); 36,67 (C-10); 38,57 (C-12); 41,79 (C-4); 44,48 (C-13); 49,78 (C-9); 56,60 (C-14); 59,35 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 60,33 (C-17); 64,18 y 64,39 ($-\text{CCH}_2-\text{CH}_2\text{O}-$); 109,27 (C-3); 115,91 (C-22); 121,76 (C-6); 140,08 (C-5); 159,71 (C-20); 166,70 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Separación de los ésteres etílicos de los ácidos 3,3-etilendioxi-

-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (34a), 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20(22)(Z)-diénico (34b), 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (34c) y 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20-diénico (34d)

La mezcla de isómeros correspondiente a las aguas madres de la recristalización del producto de la reacción del compuesto 32 con oxiclорuro de fósforo en piridina, fue separada por CLAR, utilizando metanol como solvente. Cada uno de los isómeros fue caracterizado por espectroscopía de RMN-¹H.

La proporción de cada isómero en la mezcla fue determinada por integración de cada uno de los picos del cromatograma, hallándose la siguiente composición porcentual: isómero E (34a), 41%; isómero Z (34b), 14%; isómero $\Delta^{17, 20}$ (34c), 22%; isómero Δ^{20} (34d), 23%.

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20(22)(Z)-diénico (34b)

RMN-¹H (Cl₃CD) ppm: 0,70 (s, 3H, Me-18); 1,04 (s, 3H, Me-19); 1,27 (t, J: 7 Hz, 3H, -CO₂CH₂CH₃); 1,90 (d, J: 1 Hz, 3H, Me-21); 3,96 (s, 4H, -OCH₂CH₂O-); 4,12 (c, J: 7 Hz, 2H, -CO₂CH₂CH₃); 5,36 (ba, 1H, H-6); 5,78 (ba, 1H, H-22).

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,17(20)-diénico (34c)

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,79 (s, 3H, Me-18); 1,04 (s, 3H, Me-19); 1,24 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,78 (t, J: 1 Hz, 3H, Me-21); 2,92 (s, 2H, H-22); 3,96 (s, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 4,12 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,36 (ba, 1H, H-6).

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20-diénico (34d)

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,60 (s, 3H, Me-18); 1,04 (s, 3H, Me-19); 1,27 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,06 (s, 2H, H-22); 3,96 (s, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 4,14 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,00 (d, J: 1,8 Hz, 2H, H-21); 5,36 (ba, 1H, H-6).

Ester etílico del ácido 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-24- ^{14}C (34a- ^{14}C)

El éster etílico del ácido 3,3-etilendioxi-20(R,S)-hidroxi-23-norcol-5-énico-24- ^{14}C (32- ^{14}C) (act. específica: 1,00 mCi/mmol) (126 mg; 0,28 mmoles) se disolvió en piridina anhidra (1,6 ml), se agregó lentamente oxiclóruo de fósforo (0,3 ml) y la mezcla se dejó en reposo durante 22 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (110 mg) se cromatogra-

fió en una columna de alúmina (6 g), utilizando tolueno (150 ml), como solvente de elución. Se obtuvieron 119 mg de un producto crudo que resultó ser, por análisis de su espectro de RMN- ^1H , una mezcla de cuatro isómeros. La mezcla fue separada por CLAR, utilizando metanol como solvente. Se aislaron 55 mg (45%) del compuesto 34a- ^{14}C , que se recristalizó de etanol hasta actividad específica constante (1,00 mCi/mmol).

Ester etílico del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico
(35)

Una solución del éster etílico del ácido 3,3-etilendioxi-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico (34a) (70 mg; 0,16 mmoles) en acetona (3,3 ml) fue tratada con ácido p-toluensulfónico (16,5 mg) a temperatura ambiente durante 2 días. Una vez finalizada la reacción, se evaporó la acetona, se suspendió el residuo en una solución saturada de bicarbonato de sodio (5 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). La fase orgánica fue lavada con agua (2 x 10 ml), secada y evaporado el solvente. Se obtuvo un aceite (69 mg), que se cromatografió en una columna de alúmina (4 g) y se eluyó con tolueno (150 ml). Se obtuvieron 60 mg (96%) del compuesto 35 cristalino, que se recristalizó de etanol.

p.f.: 112-113°C (Etanol).

I.R. (cm^{-1}): 1700 (tens. C=O del éster); 1660 (tens. C=C de la

cetona); 1620 (tens. C=C).

E.M.(m/e, %): 384 (M^{+} ; 100,0); 369 (M^{+} -15 ; 8,2); 339 (M^{+} -45 ; 22,1); 338 (M^{+} -46 ; 36,6); 324 (338-15 ; 9,8); 311 (M^{+} -CO₂C₂H₅ ; 9,7); 296 (7,1); 271 (M^{+} -cadena lateral ; 4,4); 245 (29,2); 244 (17,6); 230 (37,1); 215 (11,6); 214 (4,3); 200 (3,6); 199 (6,0); 147 (11,7); 124 (14,4); 113 (cadena lateral ; 8,3); 95 (53,0); 67 (30,2); 40 (25,9).

RMN-¹H (Cl₃CD) ppm: 0,64 (s, 3H, Me-18); 1,18 (s, 3H, Me-19); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, -CO₂CH₂CH₃); 2,18 (s, 3H, Me-21); 4,16 (c, J: 7 Hz, 2H, -CO₂CH₂CH₃); 5,72 (m, 2H, H-4 y H-22).

RMN-¹³C (Cl₃CD) ppm: 13,02 (Me-18); 14,33 (-CO₂CH₂CH₃); 17,33 (Me-19); 20,61 (Me-21); 20,97 (C-11); 24,13 (C-16); 24,82 (C-15); 31,82 (C-7); 32,77 (C-6); 33,85 (C-2); 35,62 (C-1); 35,78 (C-8); 38,31 (C-10); 38,57 (C-12); 44,38 (C-13); 53,75 (C-9); 55,68 (C-14); 59,43 (-CO₂CH₂CH₃); 60,12 (C-17); 116,07 (C-22); 123,65 (C-4); 159,33 (C-20); 166,70 (-CO₂CH₂CH₃); 171,16 (C-5); 199,37 (C-3).

Ester etílico del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico-24-¹⁴C (35-¹⁴C)

Una solución del éster etílico del ácido 3,3-etilendioxio-23-norcola-5,20(22)(E)-diénico-24-¹⁴C (34a-¹⁴C) (actividad específica: 1,00 mCi/mmol) (81 mg; 0,20 mmoles) fue tratada con ácido p-toluensulfónico (19 mg) a temperatura ambiente durante 2 días. Luego se evaporó la acetona, se suspendió el residuo en

una solución saturada de bicarbonato de sodio (5,8 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml). La fase orgánica fue lavada con agua (2 x 15 ml), secada y evaporado el solvente. Se obtuvo un aceite (80 mg), que se cromatografió en una columna de alúmina (5 g) y se eluyó con tolueno (200 ml). Se obtuvieron 64 mg (92%) del compuesto 35-¹⁴C, que se recristalizó de etanol hasta actividad específica constante (0,98 mCi/mmol).

Acido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico (22)

A una solución del éster etílico del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico (35) (55 mg; 0,14 mmoles) en etanol (1,5 ml), se le agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio 50% (0,2 ml) y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (0,3 ml) y la suspensión resultante se volcó sobre agua, se refrigeró y se filtró el precipitado formado, aislándose un sólido (55 mg), que fue cromatografiado en una columna de sílicagel G (3 g). Se utilizaron como solventes de elución cloruro de metileno (100 ml) y cloruro de metileno:metanol (99:1) (100 ml), obteniéndose 36 mg (71%) del compuesto 22, que se recristalizó de acetona.

p.f.: 220-221°C (Acetona).

I.R. (cm⁻¹): 3500-2500 (tens. OH); 1700 (tens. C=O del ácido);

1660 (tens. C=O de la cetona); 1620 (tens. C=C).

E.M. (m/e, %): 356 (M^{+} ; 4,5); 341 ($M^{+}-15$; 2,7); 256 (341-cadena lateral ; 1,8); 229 (M^{+} -cadena lateral- $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$; 25,0); 202 (5,4); 147 (21,4); 124 (C_8OH_{12} ; 24,0); 85 (cadena lateral ; 10,7); 79 (100,0).

RMN- ^1H (Piridina- d_5) ppm: 0,60 (s, 3H, Me-18); 1,00 (s, 3H, Me-19); 2,42 (d, J: 1 Hz, 3H, Me-21); 5,85 (s, 1H, H-4); 6,20 (ba, 1H, H-22).

RMN- ^{13}C (Piridina- d_5) ppm: 13,10 (Me-18); 17,15 (Me-19); 20,68 (Me-21); 21,16 (C-11); 24,32 (C-16); 25,11 (C-15); 32,07 (C-7); 32,74 (C-6); 34,33 (C-2); 35,77 (C-1 y C-8); 38,52 (C-10); 38,64 (C-12); 44,45 (C-13); 53,92 (C-9); 55,67 (C-14); 60,20 (C-17); 118,07 (C-22); 123,95 (C-4); 157,83 (C-20); 169,10 ($-\text{CO}_2\text{H}$).

Ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico-24- ^{14}C (22- ^{14}C)

A una solución del éster etílico del ácido 3-ceto-23-norcola-4,20(22)(E)-diénico-24- ^{14}C (35- ^{14}C) (act. específica: 0,98 mCi/mmol) (64 mg; 0,17 mmoles) en etanol (1,8 ml), se le agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio 50% (0,1 ml) y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (0,4 ml) y la suspensión resultante se volcó sobre agua, se refrigeró y se filtró el precipitado formado, aislándose un sólido (64,1 mg), que fue cromatografiado en una columna de sílicagel G (3 g). Se utilizaron como solventes de elución cloruro de metileno (100 ml) y cloruro de metileno:me-

tanol (99:1) (100 ml), obteniéndose 42 mg (71%) del compuesto $22\text{-}^{14}\text{C}$ cristalino, que se recrystalizó de acetona hasta actividad específica constante (0,95 mCi/mmol).

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-nor- 5β -colánico (37)

A una solución de acetato de $5\beta\text{H}$ -pregnanolona (36) (103 mg; 0,29 mmoles) en benceno anhidro (2 ml) se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno, zinc activado 69 (155 mg; 2,39 mmoles) y algunos cristales de iodo. A la solución calentada y agitada se agregó, gota a gota, bromoacetato de etilo seco y recién destilado (0,3 ml). La reacción fue mantenida a reflujo por el agregado del reactivo. Una vez finalizado el mismo, se calentó a reflujo durante media hora más. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo. Se disgregó el sólido formado y se extrajo con éter etílico (3 x 20 ml).

La fase orgánica se lavó con agua (1 x 25 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 25 ml) y agua (1 x 25 ml); se secó y se evaporó el solvente.

El residuo se trató con anhídrido acético y piridina (1:1) (0,8 ml) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con éter etílico (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml); se secó y se evaporó el solvente. El residuo (230 mg) se cro-

matografió en una columna de sílicagel G (9 g), utilizando como solventes de elución tolueno (100 ml) y tolueno:acetato de etilo (98:2) (250 ml). Se obtuvieron 110 mg (87%) del compuesto 37 cristalino, que se recristalizó de etanol.

p.f.: 130-131°C (Etanol).

I.R. (cm^{-1}): 3550-3400 (tens. OH); 1750 (tens. C=O).

E.M. (m/e, %): 373 (M^{+} -60-15 ; 0,7); 355 (373-18 ; 1,2); 343 (M^{+} -60-45 ; 2,5); 342 (M^{+} -60-46 ; 1,3); 257 (M^{+} -60-cadena lateral ; 0,5); 230 (2,0); 229 (4,0); 216 (3,6); 215 (4,5); 203 (1,1); 131 (cadena lateral; 100,0); 85 (20,2).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,84 (s, 3H, Me-18); 0,98 (s, 3H, Me-19); 1,24 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OR); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,35 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OS); 2,04 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,37 (ba, 1H, OH); 4,18 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,08 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,59 (Me-18 del isómero 2OS); 13,87 (Me-21 del isómero 2OR); 14,22 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 20,92 (C-11); 21,47 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 22,76 (C-16 del isómero 2OS); 23,14 (C-16 del isómero 2OR); 23,73 (C-15); 23,81 (Me-19); 24,98 (C-2); (26,02) (C-6); (26,46) (C-7); 26,76 (Me-21 del isómero 2OS); 26,96 (Me-21 del isómero 2OR); 30,61 (C-1); 30,70 (C-4); 34,83 (C-10); 35,02 (C-8); 37,29 (C-5); 39,83 (C-9); 40,51 (C-12); 43,10 (C-13 del isómero 2OS); 43,25 (C-13 del isómero 2OR); 45,83 (C-22 del isómero 2OR); 46,15 (C-22 del isómero 2OS); 56,58 (C-14 del isómero 2OR); 56,69 (C-14 del isómero 2OS); 59,17 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ del isómero 2OR); 59,38 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ del isómero 2OS);

60,43 (C-17); 70,62 (C-3); 73,23 (C-20 del isómero 20S); 73,60 (C-20 del isómero 20R); 170,39 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 172,97 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Separación de los ésteres etílicos de los ácidos 3β -acetoxi-20R-hidroxi-23-nor- 5β -colánico (37(20R)) y 3β -acetoxi-20S-hidroxi-23-nor- 5β -colánico (37(20S))

La mezcla 37(20R+20S) fue separada por CLAR utilizando metanol:agua (90:10) como solvente.

Se determinó la proporción de cada epímero en la mezcla mediante la integración del área de cada pico del cromatograma. Se encontró que el isómero 20S es el componente mayoritario (62%).

Se caracterizó cada epímero por su punto de fusión y por espectroscopía de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C .

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi-20R-hidroxi-23-nor- 5β -colánico (37(20R))

p.f.: 138-139°C (Etanol).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,85 (s, 3H, Me-18); 0,99 (s, 3H, Me-19); 1,24 (s, 3H, Me-21); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,03 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,39 (ba, 1H, OH); 4,19 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,09 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,87 (Me-18); 14,22 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 20,91 (C-11); 21,47 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 23,15 (C-16); 23,73 (C-15); 23,81

(Me-19); 24,99 (C-2); (26,03) (C-6); (26,46) (C-7); 26,97 (Me-21); 30,61 (C-1); 30,71 (C-4); 34,83 (C-10); 35,02 (C-8); 37,29 (C-5); 39,82 (C-9); 40,51 (C-12); 43,25 (C-13); 45,83 (C-22); 56,59 (C-14); 59,17 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 60,43 (C-17); 70,62 (C-3); 73,61 (C-20); 170,40 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 172,96 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi-20S-hidroxi-23-nor- 5β -colánico (37(20S))

p.f.: 157-158°C (Etanol).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,85 (s, 3H, Me-18); 0,99 (s, 3H, Me-19); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,36 (s, 3H, Me-21); 2,04 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,40 (ba, 1H, OH); 4,19 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,09 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 13,58 (Me-18); 14,22 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 20,90 (C-11); 21,49 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 22,77 (C-16); 23,80 (Me-19); 24,98 (C-2); (26,02) (C-6); (26,44) (C-7); 26,76 (Me-21); 30,60 (C-1); 30,69 (C-4); 34,80 (C-10); 34,98 (C-8); 37,30 (C-5); 39,80 (C-9); 40,49 (C-12); 43,10 (C-13); 46,16 (C-22); 56,69 (C-14); 59,39 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 60,44 (C-17); 70,62 (C-3); 73,23 (C-20); 170,41 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 172,95 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C (37- ^{14}C)

A una solución de acetato de 5β -pregnanolona (36) (80 mg;

0,23 mmoles) en benceno anhidro (1,6 ml) se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno, zinc activado ⁶⁹ (120 mg; 1,85 mmoles) y algunos cristales de iodo. A la solución calentada y agitada se agregó, gota a gota, bromoacetato de etilo-(1-¹⁴C) (0,21 ml) (act. específica: 1,00 mCi/mmol). La reacción fue mantenida a reflujo por el agregado del reactivo. Una vez finalizado el mismo, se calentó a reflujo durante media hora más. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo. Se disgregó el sólido gomoso formado y se extrajo con éter etílico (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml); se secó y se evaporó el solvente.

El residuo se trató con anhídrido acético y piridina (1:1) (0,5 ml) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con éter etílico (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml); se secó y se evaporó el solvente. El residuo (162 mg) se cromatografió en una columna de sílicagel G (6 g), utilizando como solvente de elución tolueno (100 ml) y tolueno: acetato de etilo (98:2) (200 ml). Se obtuvieron 85 mg (85%) del compuesto 37-¹⁴C cristalino, que se recrystalizó de etanol hasta actividad específica constante (1,04 mCi/mmol).

Acido 3 β ,20(R,S)-dihidroxi-23-nor-5 β -colánico (19)

Se disolvió el éster etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-nor- 5β -colánico (37) (85 mg; 0,19 mmoles) en metanol (1,3 ml) y se le agregó una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,2 ml). La solución resultante fue calentada a reflujo durante 3 horas, al cabo de las cuales se evaporó el metanol y se diluyó con agua (5 ml). Se extrajo con éter etílico (2 x 5ml) para eliminar restos de 5β -pregnanolona. Por acidificación con ácido clorhídrico 2N (1 ml) de la fase acuosa remanente, precipitó un sólido. La mezcla fue extraída con éter etílico (3 x 5 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 5 ml) hasta neutralidad; se secó y se evaporó el solvente, obteniéndose 61 mg (84%) del compuesto 19 cristalino, que se recristalizó de acetona.

p.f.: 202-204°C (Acetona).

I.R. (cm^{-1}): 3600-3050 (tens. OH); 1730 (tens. C=O).

E.M. (m/e, %): 360 (M^{+} -18 ; 1,5); 345 (360-15 ; 2,2); 342 (360-18 ; 1,9); 327 (342-15 ; 2,6); 318 (M^{+} -46 ; 6,2); 300 (360-60 ; 20,9); 285 (300-15 ; 7,6); 275 (M^{+} -cadena lateral ; 4,3); 260 (275-15 ; 4,3); 257 (360-cadena lateral ; 6,8); 248 (2,0); 247 (2,0); 246 (4,3); 242 (257-15 ; 4,1); 234 (9,6); 233 (10,4); 217 (10,5); 215 (36,4); 203 (6,2); 163 (8,0); 162 (13,1); 161 (19,4); 103 (cadena lateral ; 57,4); 85 (26,3); 43 (100,0).

RMN- ^1H (Piridina- d_5) ppm: 1,02 (s, 6H, Me-18 y Me-19); 1,56 (s, 3H, Me-21 del isómero 20R); 1,72 (s, 3H, Me-21 del isómero 20S); 2,80 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$); 4,34 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Piridina- d_5) ppm: 14,07 (Me-18 del isómero 20S); 14,28

(Me-18 del isómero 2OR); 21,33 (C-11); 23,23 (C-16 del isómero 2OS); 23,49 (C-16 del isómero 2OR); 24,24 (C-15 y Me-19); 26,56 (C-2); 27,25 (C-7); 27,70 (Me-21 del isómero 2OS); 28,16 (Me-21 del isómero 2OR); 28,62 (C-6); 30,57 (C-1); 34,41 (C-4); 35,31 (C-8); 35,41 (C-10); 37,05 (C-5); 40,00 (C-9); 40,87 (C-12); 43,42 (C-13 del isómero 2OS); 43,57 (C-13 del isómero 2OR); 46,90 (C-22 del isómero 2OR); 48,33 (C-22 del isómero 2OS); 56,82 (C-14 del isómero 2OR); 56,91 (C-14 del isómero 2OS); 59,16 (C-17); 66,08 (C-3); 73,19 (C-20 del isómero 2OS); 73,40 (C-20 del isómero 2OR); 175,45 ($-\text{CO}_2\text{H}$ del isómero 2OR); 175,76 ($-\text{CO}_2\text{H}$ del isómero 2OS).

Acido $3\beta,20(\text{R,S})$ -dihidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C ($19\text{-}^{14}\text{C}$)

Se disolvió el éster etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C ($37\text{-}^{14}\text{C}$) (act, específica: 1,04 mCi/mmol) (80 mg; 0,18 mmoles) en metanol (1,2 ml) se le agregó una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,17 ml). La solución resultante fue calentada a reflujo durante 3 horas, al cabo de las cuales se evaporó el metanol y se diluyó con agua (5 ml). Se extrajo con éter etílico (2 x 5 ml) para eliminar restos de 5β -pregnanolona. Por acidificación con ácido clorhídrico 2N (1 ml) de la fase acuosa remanente, precipitó un sólido. La mezcla fue extraída con éter etílico (3 x 5 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 5 ml) hasta neutralidad; se secó y se evaporó el solvente, obteniéndose

57 mg (84%) del compuesto 19-¹⁴C, que se recrystalizó de acetona hasta actividad específica constante (1,0 mCi/mmol).

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-
-énico (38a)

El éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-nor-5 β -colánico (37) (110 mg; 0,25 mmoles) se disolvió en piridina anhidra (1,4 ml), se agregó lentamente oxiclورو de fósforo (0,24 ml) y la mezcla se dejó en reposo durante 22 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con clورو de metileno (3 x 20 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (100 mg) se cromatografió en una columna de alúmina (5 g), utilizando tolueno (150 ml) como solvente de elución. Se obtuvieron 73 mg de un producto crudo que resultó ser, por análisis de su espectro de RMN-¹H, una mezcla de cuatro isómeros.

Dicha mezcla fue recrystalizada 2 veces de etanol, obteniéndose 21 mg (20%) del compuesto 38a, homogéneo por CGL.

p.f.: 108-109°C (Etanol).

I.R. (cm⁻¹): 1720 (tens. C=O); 1640 (tens. C=C).

E.M. (m/e, %): 430 (M⁺ ; 0,8); 370 (M⁺-60 ; 4,0); 355 (370-15 ; 2,3); 305 (370-45 ; 1,2); 309 (355-46 ; 1,2); 296 (0,8);

257 (370-cadena lateral ; 0,8); 255 (2,3); 242 (257-15 ; 5,0); 230 (8,1); 229 (11,5); 216 (15,4); 215 (39,6); 203 (2,7); 113 (cadena lateral ; 21,5); 95 (100,0).

RMN-¹H (Cl₃CD) ppm: 0,56 (s, 3H, Me-18); 0,94 (s, 3H, Me-19); 1,26 (t, J: 7 Hz, 3H, -CO₂CH₂CH₃); 2,05 (s, 3H, -CO₂CH₃); 2,16 (d, J: 1,5 Hz, 3H, Me-21); 4,14 (c, J: 7 Hz, 2H, -CO₂CH₂CH₃); 5,06 (ba, 1H, H-3); 5,06 (ba, 1H, H-3); 5,68 (m, 1H, H-22).

RMN-¹³C (Cl₃CD) ppm: 13,18 (Me-18); 14,39 (-CO₂CH₂CH₃); 20,71 (Me-21); 21,08 (C-11); 21,50 (-CO₂CH₃); 23,83 (Me-19); 24,26 (C-16); 25,03 (C-2 y C-15); 26,14 (C-6); 26,45 (C-7); 30,63 (C-1); 30,77 (C-4); 34,94 (C-10); 35,96 (C-8); 37,36 (C-5); 38,94 (C-12); 40,10 (C-9); 44,84 (C-13); 56,48 (C-14); 59,38 (-CO₂CH₂CH₃); 60,52 (C-17); 70,61 (C-3); 115,91 (C-22); 159,80 (C-20); 166,77 (-CO₂CH₂CH₃); 170,44 (-CO₂CH₃).

Separación de los ésteres etílicos de los ácidos 3β-acetoxi-23-nor-5β-col-20(22)(E)-énico (38a), 3β-acetoxi-23-nor-5β-col-20(22)(Z)-énico (38b), 3β-acetoxi-23-nor-5β-col-17(20)-énico (38c) y 3β-acetoxi-23-nor-5β-col-20-énico (38d)

La mezcla de isómeros correspondientes a las aguas madres de la recristalización del producto de la reacción del compuesto 37 con oxiclорuro de fósforo en piridina, fue separada por CLAR, utilizando metanol como solvente. Cada uno de los isómeros fue caracterizado por espectroscopía de RMN-¹H.

La proporción de cada isómero en la mezcla fue determinada por integración de cada uno de los picos del cromatograma, hallándose la siguiente composición porcentual: isómero E (38a), 50%; isómero Z (38b), 14%; isómero $\Delta^{17, 20}$ (38c), 15%; isómero Δ^{20} (38d), 21%.

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-20(22)(Z)-
-énico (38b)

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,67 (s, 3H, Me-18); 0,98 (s, 3H, Me-19); 1,27 (t, J: 7Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,90 (d, J: 1,5 Hz, 3H, Me-21); 2,06 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 4,12 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,06 (ba, 1H, H-3); 5,78 (ba, 1H, H-22).

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-17(20)-énico
co (38c)

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,84 (s, 3H, Me-18); 0,97 (s, 3H, Me-19); 1,23 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,74 (t, J: 1,7 Hz, 3H, Me-21); 2,04 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2,90 (s, 2H, H-22); 4,14 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,06 (ba, 1H, H-3).

Ester etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-20-énico (38d)

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,54 (s, 3H, Me-18); 0,94 (s, 3H, Me-19); 1,22 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,02 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,02 (s, 2H, H-22); 4,12 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,94 (d, J: 1,8 Hz, H-21); 5,01 (ba, 1H, H-3).

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-
-énico-24- ^{14}C ($38a$ - ^{14}C)

El éster etílico del ácido 3β -acetoxi-20(R,S)-hidroxi-23-nor-5 β -colánico-24- ^{14}C (27 - ^{14}C) (act. específica: 1,04 mCi/mmol) (110 mg; 0,25 μmoles) se disolvió en piridina anhidra (1,4 ml). Se agregó lentamente oxloruro de fósforo (0,3 ml) y la mezcla se dejó en reposo durante 22 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml); se secó y se evaporó el solvente. El residuo se cromatografió en una columna de alúmina (5 g), utilizando tolueno (150 ml) como solvente de elución.

Se obtuvieron 73 mg de un producto crudo que resultó ser, tal como en el caso del ensayo no radiactivo, una mezcla de cuatro isómeros. Dicha mezcla fue separada por CLAR, utilizando metanol como solvente. Se obtuvieron 46 mg (44%) del compuesto $38a$ - ^{14}C , que se recristalizó de etanol hasta actividad específica constante (0,90 mCi/mmol).

Acido 3 β -hidroxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-énico (23)

A una solución del éster etílico del ácido 3 β -acetoxi-23-nor-5 β -col-20(22)(E)-énico (38a) (73 mg; 0,17 mmoles) en etanol se le agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio 50% (0,2 ml) y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (0,3 ml) y la suspensión resultante se volcó sobre agua (2 ml), se refrigeró y se filtró el precipitado formado, aislándose 59 mg (86%) del producto 23 cristalino, que se recristalizó de etanol.

p.f.: 132-133°C (Etanol).

I.R. (cm⁻¹): 3500-2500 (tens. OH); 1670 (tens. C=O); 1630 (tens. C=C).

E.M. (m/e, %): 360 (M⁺ ; 1,2); 342 (M⁺-18 ; 7,1); 327 (342-15 ; 7,0); 288 (342-C₄H₆ ; 3,6); 242 (327-cadena lateral ; 3,6); 233 (M⁺-cadena lateral-15 ; 9,5); 215 (69,0); 203 (3,6); 163 (7,1); 162 (13,1); 161 (27,4); 93 (100,0); 85 (cadena lateral ; 14,3).
 RMN-¹H (Piridina-d₅) ppm: 0,62 (s, 3H, Me-18); 1,00 (s, 3H, Me-19); 2,44 (s, 3H, Me-21); 3,42 (s, 1H, OH); 6,20 (s, 1H, H-22).
 RMN-¹³C (Piridina-d₅) ppm: 12,84 (Me-18); 20,35 (C-11); 20,94 (Me-21); 23,77 (Me-19); 24,03 (C-16); 24,82 (C-15); 26,14 (C-7); 26,73 (C-2); 28,26 (C-6); 30,19 (C-1); 34,00 (C-4); 35,04 (C-8); 35,73 (C-10); 36,63 (C-5); 38,73 (C-12); 39,73 (C-9); 44,46 (C-13); 55,97 (C-14); 60,12 (C-17); 65,60 (C-3); 117,45 (C-22); 157,80 (C-20); 168,71 (-CO₂H).

Acido 3β -hidroxi-23-nor- 5β -col-20(22)(E)-énico-24- ^{14}C (23 - ^{14}C)

A una solución del éster etílico del ácido 3β -acetoxi-23-nor- 5β -col-20(22)(E)-énico-24- ^{14}C ($38a$ - ^{14}C) (act. específica: 0,90 mCi/mmol) (40 mg; 0,09 mmoles) en etanol (1,1 ml), se le agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio 50% (0,08 ml) y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (0,2 ml) y la suspensión resultante se volcó sobre agua (2 ml), se refrigeró y se filtró el precipitado formado, aislándose 33 mg (86%) del compuesto 23 - ^{14}C cristalino, que se recrystalizó de etanol hasta actividad específica constante (0,92 mCi/mmol).

3β -acetil-digitoxigenina (41)

Se disolvió digitoxina (2) (1,0 g; 1,3 mmoles) en metanol (50 ml), se agregó ácido sulfúrico 0,1N (50 ml) y se calentó a reflujo durante 40 minutos. Se evaporó el metanol y la solución acuosa se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 20 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 20 ml) y agua (1 x 20 ml), se secó y se evaporó el solvente.

El residuo (524 mg) se trató con piridina (12,8 ml) y anhídrido acético (6,4 ml) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se filtró el sólido precipitado, obteniéndose 512 mg (94%) del

compuesto 41 cristalino, que se recrystalizó de acetona-éter.

p.f.: 227-228°C (Acetona-éter) (Lit. 72: 227°C (Acetona-éter)).

I.R. (cm^{-1}): 3550 (tens. OH); 1785 (tens. C=O del éster); 1745 (tens. C=O de la lactona); 1624 (tens. C=C); 1620 (tens. C-O).

E.M. (m/e, %): 416 (M^{+} ; 0,5); 356 ($\text{M}^{+}-60$; 4,0); 341 (356-15 ; 1,0); 338 (356-18 ; 1,0); 323 (338-15 ; 0,5); 258 (341-cadena lateral ; 2,0); 246 (34,0); 231 (11,0); 202 (100,0).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,93 (s, 3H, Me-18) ; 1,02 (s, 3H, Me-19); 1,41 (s, 1H, OH); 2,10 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 4,95 (s, 2H, H-21); 5,12 (ba, 1H, H-3); 5,95 (s, 1H, H-22).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 15,75 (Me-18); 21,16 (C-11 y C-7); 21,42 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 23,63 (Me-19); 24,97 (C-2); 26,32 (C-6); 26,86 (C-16); 30,39 (C-1 y C-4); 32,97 (C-15); 35,12 (C-10); 35,54 (C-9); 36,77 (C-5); 39,82 (C-12); 41,60 (C-8); 49,62 (C-13); 50,87 (C-17); 70,31 (C-3); 73,47 (Me-21); 85,12 (C-14); 117,26 (C-22); 170,42 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 174,42 (C-23); 174,84 (C-20).

3 β -acetoxi-14 β ,21-dihidroxi-5 β -pregnanolona (42)

Se disolvió 3 β -acetil-digitoxigenina (410 (752 mg; 1,8 mmoles) en cloruro de metileno (60 ml). El sistema se enfrió a -60°C y se pasó corriente de ozono. A los 10 minutos la solución estaba celeste y a los 20 minutos se comprobó por CCD (sistema 5) la desaparición del producto de partida. Se dejó al sistema alcanzar la temperatura ambiente y se agregó zinc (2,8 g)

y ácido acético (18,5 ml). Se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Se filtró el zinc y se separó la fase orgánica, que se lavó con agua (1 x 20 ml), solución acuosa de carbonato de sodio 10% (1 x 20 ml) y agua (1 x 20 ml). Se evaporó el solvente y el residuo (907 mg) se disolvió en metanol (25,5 ml) y se le agregó una solución acuosa de bicarbonato de potasio 10%. Se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se agregó agua (25 ml) y se evaporó el metanol. Se extrajo con cloruro de metileno (4 x 20 ml); la fase orgánica se lavó con agua (2 x 20 ml), se secó y se evaporó el solvente.

El residuo (777 ml) se cromatografió en una columna de sílica H (30 g) y se eluyó con cloruro de metileno (500 ml) y cloruro de metileno:metanol (99,5:0,5) (1000 ml), con presión de aire. Se obtuvieron 545 mg (77%) del compuesto 42, que se recristalizó de éter etílico.

p.f.: 148-149°C (Eter etílico) (Lit. 43: 148-149°C (Eter etílico)).

I.R. (cm^{-1}): 3400 (tens. OH); 1700 (tens. C=O).

E.M. (m/e, %): 392 (M^{+} ; 1,1); 374 (M^{+} -18 ; 0,5); 361 (M^{+} -31 ; 4,5); 333 (M^{+} -cadena lateral ; 1,7); 332 (M^{+} -60 ; 0,4); 314 (332-18 ; 1,0); 302 (25,9); 301 (332-31 ; 100,0); 273 (332-cadena lateral ; 8,6); 255 (314-cadena lateral ; 8,8).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,92 (s, 3H, Me-18); 0,98 (s, 3H, Me-19); 2,06 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,06 (ba, 1H, OH de C-21); 4,08 (ba, 1H, OH de C-14); 4,29 (ba, 2H, H-21); 5,10 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 15,27 (Me-18); 20,84 (C-11); 21,45 (C-7 y

-CO₂CH₃); 23,74 (Me-19); 24,88 (C-16); 25,03 (C-2); 26,35 (C-6); 30,48 (C-1 y C-4); 33,93 (C-15); 35,15 (C-9 y C-10); 36,88 (C-5); 39,11 (C-12); 40,05 (C-8); 49,74 (C-13); 57,81 (C-17); 70,07 (C-21); 70,35 (C-3); 84,82 (C-14); 170,39 (-CO₂CH₃); 216,91 (C-20).

Acido 3 β -acetoxi-14 β -hidroxi-5 β -androstan-17 β -carboxílico (43)

Se disolvió 3 β -acetoxi-14 β ,21-dihidroxi-5 β -pregnanolona (42) (190 mg; 0,49 mmoles) en metanol (1,2 ml) y se le agregó una solución de ácido peryódico (146 mg) en agua (0,4 ml). La solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporó el solvente y se agregó agua (10 ml). Se extrajo con cloruro de metileno (4 x 5 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), se secó y se evaporó el solvente. Se aislaron 160 mg (86%) del compuesto 43, que se recristalizó de acetona-éter etílico.

p.f.: 230-231°C (Acetona-éter etílico) (Lit. 43: 232°C (Acetona-éter etílico)).

I.R. (cm⁻¹): 3500-3200 (tens. OH); 1770 (tens. C=O del ácido); 1720 (tens. C=O del éster).

E.M. (m/e, %): 378 (M⁺• ; 0,5); 360 (M⁺•-18 ; 0,5); 318 (M⁺•-60 ; 5,6); 303 (318-15 ; 2,2); 300 (318-18 ; 8,9); 285 (300-15 ; 5,6); 273 (318-cadena lateral ; 2,7); 255 (300-cadena lateral ; 2,5); 246 (2,2); 231 (22,2); 94,0 (100,0).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,99 (s, 3H, Me-18); 1,11 (s, 3H, Me-19); 2,08 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2,68 (ba, 1H, OH); 5,09 (ba, 1H, H-3).
 RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 15,01 (Me-18); 20,79 (C-11); 21,33 (C-7); 21,47 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 23,69 (Me-19); 24,42 (C-16); 25,02 (C-2); 26,28 (C-6); 30,48 (C-1 y C-4); 33,33 (C-15); 35,18 (C-10); 35,28 (C-9); 36,85 (C-5); 38,30 (C-12); 40,02 (C-8); 48,71 (C-13); 56,99 (C-17); 70,46 (C-3); 86,97 (C-14); 170,59 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 180,32 (C-20).

3 β -acetoxi-14 β -hidroxi-21-metansulfoniloxi-5 β -pregnan-20-ona (45)

Se disolvió 3 β -acetoxi-14 β ,21-dihidroxi-5 β -pregnan-20-ona (42) (855 mg; 2,2 mmoles) en piridina anhidra (9,7 ml) y se le agregó cloruro de mesilo (1 ml). La solución resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una vez finalizada la reacción, se agregó una mezcla de agua y hielo. Se extrajo con cloruro de metileno (3 x 30 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 30 ml), ácido clorhídrico 2N (1 x 30 ml) y agua (1 x 30 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (951 mg) se cromatografió en una columna de sílicagel G (50 g) y se eluyó con cloruro de metileno (400 ml), cloruro de metileno:metanol (99,5:0,5) (300 ml) y cloruro de metileno:metanol (99:1) (400 ml), obteniéndose 813 mg (80%) del compuesto 45, que se recristalizó de éter etílico.

p.f.: 164-165°C (Eter etílico).

I.R. (cm^{-1}): 1710 (tens. C=O); 1370 y 1170 (tens. C-O-SO₂C).

E.M. (m/e, %): 470 (M^{+} ; 0,5); 452 ($M^{+}-18$; 1,5); 392 (452-60 ; 11,0); 377 (392-15 ; 5,0); 356 (3,0); 343 (10,0); 338 (5,0); 296 (32,5); 283 (54,0); 268 (9,2); 255 (392-cadena lateral ; 64,0); 214 (14,0); 106(100,0).

RMN- 1H (Cl_3CD) ppm: 0,98 (s, 6H, Me-18 y Me-19); 2,06 (s, 3H, $-CO_2CH_3$); 3,23 (s, 3H, $-SO_3CH_3$); 3,40 (ba, 1H, OH); 4,88 (s, 2H, $-CH_2OSO_2CH_3$); 5,08 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 15,37 (Me-18); 20,82 (C-11); 21,44 (C-7 y $-CO_2CH_3$); 23,72 (Me-19); 24,71 (C-16); 25,03 (C-2); 26,34 (C-6); 30,48 (C-1 y C-4); 33,88 (C-15); 35,15 (C-9 y C-10); 36,86 (C-5); 39,12 (C-8 y C-12); 40,10 ($-SO_3CH_3$); 50,11 (C-13); 57,45 (C-17); 70,30 (C-3); 72,58 (C-21); 84,93 (C-14); 170,39 ($-CO_2CH_3$); 209,92 (C-20).

3 β -acetoxi-14 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (39)

A 513 mg (1,1 mmoles) de 3 β -acetoxi-14 β -hidroxi-21-metansulfoniloxi-5 β -pregnan-20-ona (45) se le agregó una solución de yoduro de sodio (941 mg) en ácido acético glacial (7,2 ml) y la solución resultante se agitó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se volcó sobre una solución de bisulfito de sodio 0,2N (50 ml) y se extrajo con cloruro de metileno (4 x 20 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 20 ml), se secó y se evaporó el solvente. El residuo (360 mg) se cromatografió en una columna de sílica H (14 g) y se eluyó con cloruro de metileno (500 ml), con presión de

aire, obteniéndose 288 mg (70%) del compuesto 39, que se recristalizó de metanol.

p.f.: 141-142°C (Metanol) (Lit. 44: 150-151°C).

I.R. (cm^{-1}): 3400 (tens. OH); 1740 (tens. C=O del éster); 1700 (tens. C=O de la cetona).

E.M. (m/e, %): 376 (M^{+} ; 0,8); 358 (M^{+} -18 ; 1,6); 48 (7,8); 316 (M^{+} -60 ; 1,0); 298 (316-18 ; 3,1); 290 (43,8); 283 (298-15 ; 1,6); 273 (316-cadena lateral ; 7,8); 255 (298-cadena lateral ; 10,2); 97 (100,0).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,97 (s, 6H, Me-18 y Me-19); 2,06 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 2,24 (s, 3H, Me-21); 4,38 (ba, 1H, OH); 5,06 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 15,36 (Me-18); 20,88 (C-11); 21,48 (C-7 y $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 23,79 (Me-19); 24,94 (C-16); 25,10 (C-2); 26,40 (C-6); 30,56 (C-1 y C-4); 33,29 (Me-21); 33,96 (C-15); 35,18 (C-9 y C-10); 36,97 (C-5); 39,25 (C-12); 39,97 (C-8); 49,27 (C-13); 62,36 (C-17); 70,45 (C-3); 84,80 (C-14); 170,43 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 217,43 (C-20).

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi- 14β , $20(\text{R},\text{S})$ -dihidroxi- 23 -nor- 5β -colánico (40)

A una solución de 3β -acetoxi- 14β -hidroxi- 5β -pregnan-20-ona (39) (79 mg; 0,20 mmoles) en benceno anhidro (1 ml) se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno, zinc activado 69 (113 mg; 1,74

mmoles) y algunos cristales de iodo. A la solución calentada y agitada se agregó, gota a gota, bromoacetato de etilo seco y recién destilado (0,2 ml). La reacción fue mantenida a reflujo por el agregado del reactivo. Una vez finalizado el mismo, se calentó a reflujo durante media hora más. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo. Se disgregó el sólido formado y se extrajo con éter etílico (3 x 10 ml).

La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml); se secó y se evaporó el solvente.

El residuo (123 mg) se cromatografió en una columna de sílica H (4 g), utilizando como solventes de elución cloruro de metileno (200 ml) y cloruro de metileno:metanol (99:1) (100 ml). Se aislaron 27 mg (34%) del producto de partida que no reaccionó y 42 mg del producto de reacción (40) (43%), que se recrystalizó de metanol.

p.f.: 160-161°C (Metanol).

I.R. (cm^{-1}): 3550-3300 (tens. OH); 1720 y 1700 (tens. C=O).

E.M. (m/e, %): 446 (M^{+} -18 ; 2,3); 428 (446-18 ; 1,0); 386 (446-60 ; 0,6); 368 (428-60 ; 0,6); 273 (M^{+} -60-cadena lateral ; 1,2); 255 (386-cadena lateral ; 1,3); 131 (cadena lateral ; 37,4); 43 (100,0).

RMN- ^1H (Cl_3CD) ppm: 0,98 (s, 6H, Me-18 y Me-19); 1,27 (s, 3H, Me-21 del isómero 2OR); 1,28 (t, J: 7 Hz, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,43 (Me-21 del isómero 2OS); 2,05 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 4,06 (ba, 1H, OH); 4,20 (c, J: 7 Hz, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,08 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Cl_3CD) ppm: 14,18 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 18,07 (Me-18); 20,56 (C-11); 21,49 (C-7 y $-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 23,81 (C-16 y Me-19); 25,07 (C-2); 26,55 (Me-21 del isómero 20S); 27,03 (Me-21 del isómero 20R); 30,56 (C-1 y C-4); 31,81 (C-15); 35,20 (C-9 y C-10); 37,03 (C-5); 39,62 (C-12); 42,34 (C-8); 45,38 (C-13); 48,73 (C-22); 58,79 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 60,74 (C-17); 70,54 (C-3); 73,60 (C-20); 84,13 (C-14); 170,49 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); 173,44 ($-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Ester etílico del ácido 3β -acetoxi- 14β ,20(R,S)-dihidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C (40- ^{14}C)

A una solución de 3β -acetoxi- 14β -hidroxi- 5β -pregnan-20-ona (39) (50 mg; 0,13 mmoles) en benceno anhidro (0,7 ml) se agregó, bajo atmósfera de nitrógeno, zinc activado (71 mg; 1,1 mmoles) y algunos cristales de iodo. A la solución calentada y agitada se agregó, gota a gota, bromoacetato de etilo-(1- ^{14}C) (act. específica: 1,0 mCi/mmol) (0,13 ml). La solución fue mantenida a reflujo por el agregado del reactivo. Una vez finalizado el mismo, se calentó a reflujo media hora más. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico y hielo. Se disgregó el sólido formado y se extrajo con éter etílico (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 10 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 10 ml) y agua (1 x 10 ml), se secó y se evaporó el solvente.

El residuo (69 mg) se cromatografió en una columna de sílica H (3 g) y se eluyó con cloruro de metileno (100 ml) y clo-

ruro de metileno:metanol (99:1) (100 ml). Se aislaron 27 mg (43%) del producto $40\text{-}^{14}\text{C}$ cristalino, que se recrystalizó de metanol hasta actividad específica constante (1,08 mCi/mmol). Se recuperaron 17 mg (34%) del producto de partida sin reaccionar.

Acido $3\beta,14\beta,20(R,S)$ -trihidroxi-23-nor- 5β -colánico (20)

Se disolvió el éster etílico del ácido 3β -acetoxi- $14\beta,20(R,S)$ -dihidroxi-23-nor- 5β -colánico (40) (76 mg; 0,16 mmoles) en metanol (2 ml) y se le agregó una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,2 ml). La solución resultante fue calentada a reflujo durante 3 horas, al cabo de las cuales se evaporó el metanol y se acidificó con ácido clorhídrico. La suspensión resultante se volcó sobre agua (5 ml), se refrigeró y se filtró el precipitado formado, obteniéndose 46 mg (71%) del compuesto 20 cristalino, que se recrystalizó de acetona.

p.f.: 186-187°C (Acetona).

I.R. (cm^{-1}): 3500-3000 (tens. OH); 1720 (tens. C=O).

E.M. (m/e, %): 359 (24,7); 358 ($\text{M}^{+}-36$; 100,0); 343 (358-15 ; 5,1); 316 ($\text{M}^{+}-18-60$; 13,1); 301 (316-15; 3,7); 298 (358-60 ; 3,4); 283 (298-15 ; 1,9); 273 (358-cadena lateral ; 9,9); 258 ($\text{M}^{+}-18-15$ -cadena lateral ; 1,8); 255 (358-cadena lateral ; 20,5); 227 (2,8); 103 (cadena lateral ; 25,7); 43 (63,5).

RMN- ^1H (Piridina- d_5) ppm: 1,02 (s, 6H, Me-18 y Me-19); 1,42 (s, 3H, Me-21 del isómero 20R); 1,80 (s, 3H, Me-21 del isómero

20S); 2,94 (s, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2\text{CO}_2\text{H}$); 4,34 (ba, 1H, H-3).

RMN- ^{13}C (Piridina- d_5) ppm: 19,52 (Me-18); 22,16 (C-11 y C-7); 23,96 (C-16); 24,50 (Me-19); 27,28 (Me-21 del isómero 20S); 28,61 (Me-21 del isómero 20R); 28,71 (C-6); 30,36 (C-1); 31,92 (C-15); 34,19 (C-4); 35,61 (C-9 y C-10); 36,89 (C-5); 39,82 (C-8 y C-12); 43,47 (C-13); 48,32 (C-22); 61,84 (C-17); 66,03 (C-3); 72,82 (C-20); 175,26 ($-\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{H}$).

Acido $3\beta, 14\beta, 20(\text{R}, \text{S})$ -trihidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C ($20\text{-}^{14}\text{C}$)

Se disolvió el éster etílico del ácido 3β -acetoxi- $14\beta, 20(\text{R}, \text{S})$ -dihidroxi-23-nor- 5β -colánico-24- ^{14}C ($40\text{-}^{14}\text{C}$) (act. específica: 1,08 mCi/mmol) (37,0 mg; 0,08 mmoles) en metanol (1ml) y se le agregó una solución acuosa de hidróxido de potasio 50% (0,1 ml). La solución resultante fue calentada a reflujo durante 3 horas, al cabo de las cuales se evaporó el metanol y se acidificó con ácido clorhídrico. La suspensión resultante se volcó sobre agua (5 ml), se refrigeró y se filtró el precipitado formado, obteniéndose 22 mg (71%) del compuesto $20\text{-}^{14}\text{C}$ cristalino, que se recrystalizó de acetona hasta actividad constante (0,98 mCi/mmol).

B. Síntesis de 3 β ,20-dihidroxi-20-metil-pregn-5-eno y 3 β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno

3 β ,20-dihidroxi-20-metil-pregn-5-eno

Síntesis de metil-litio: se disolvió ioduro de metilo (1,3 ml; 20,1 mmoles) en éter de petróleo (4 ml), se enfrió a 0°C y se agregó, gota a gota, una solución de butil-litio 5M (3,5 ml) al mismo tiempo que comenzaba a precipitar el metil-litio. Se centrifugó, se decantó el éter de petróleo y se lavó una vez con éter de petróleo.

El metil-litio sintetizado se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se le agregó una solución de acetato de pregnenolona (24) (1 g; 2,9 mmoles) en tetrahidrofurano (20 ml). Se calentó a reflujo durante 1 hora. A continuación, se volcó sobre una solución saturada de cloruro de amonio en agua (50 ml), se separó la fase orgánica, se lavó con agua (1 x 10 ml), se secó y se evaporó el solvente. Se obtuvieron 763 mg (83%) del compuesto 46 cristalino, que se recristalizó de metanol.

p.f.: 193-194°C (Metanol) (Lit. 50: 194-195°C (Metanol-cloroformo)).

I.R. (cm⁻¹): 3600-3250 (tens. OH); 1150 (tens. C-O).

RMN-¹³C (Piridina-d₅) ppm: 13,79 (Me-18); 19,67 (Me-19); 21,37 (C-11); 23,63 (C-16); 24,32 (C-15); 30,69 y 31,75 (Me-21 y Me-22); 31,95 (C-8); 32,25 (C-7); 32,64 (C-2); 36,96 (C-10); 37,87 (C-1);

40,59 (C-12); 43,07 (C-13); 43,49 (C-4); 50,59 (C-9); 57,24 (C-14); 60,88 (C-17); 71,26 (C-3); 72,05 (C-20); 121,11 (C-6); 141,86 (C-5).

3 β -acetoxi-20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno (47)

El compuesto 46 (117 mg; 0,35 mmoles) se trató con anhídrido acético y piridina (1:1) (1,6 ml) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo. Se filtró, se lavó con agua (2 x 20 ml) y se secó en desecador. Se obtuvieron 118 mg (89%) del compuesto 47 cristalino, que se recristalizó de metanol.

p.f.: 142-143°C (Metanol).

I.R. (cm⁻¹): 3600-3250 (tens. OH); 1740 (tens. C=O); 1250-1200 (tens. C-O del grupo acetato); 1150 (tens. C-O del alcohol).

RMN-¹³C (Cl₃CD) ppm: 13,45 (Me-18); 19,30 (Me-19); 20,86 (C-11); 21,39 (-CO₂CH₃); 23,10 (C-16); 23,81 (C-15); 27,74 (C-2); (30,05) (Me-21); (30,95) (Me-22); 31,28 (C-8); 31,73 (C-7); 36,57 (C-10); 36,95 (C-1); 38,07 (C-4); 40,01 (C-12); 42,69 (C-13); 49,92 (C-9); 56,72 (C-14); 60,15 (C-17); 73,37 (C-20); 73,87 (C-3); 122,32 (C-6); 139,51 (C-5); 170,26 (-CO₂CH₃).

C. Método de inoculación de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-nor-colanoicos-24-¹⁴C y 23-norcol-20(22)(E)-énicos-24-¹⁴C en plantas *Digitalis purpurea*

Todos los ensayos de administración de los compuestos sintetizados, marcados con ¹⁴C en el C-24, se realizaron con plantas *Digitalis purpurea* de 5 meses de desarrollo. En todos los casos se utilizó una planta entera y los compuestos radiactivos, disueltos en una mezcla de cloruro de metileno: etanol (70:30), fueron administrados con ayuda de un capilar, sobre la superficie de las hojas. Estas habían sido previamente desengrasadas frotándolas con un algodón embebido en acetato de etilo.

Las cantidades administradas fueron del orden de 1,4 a 3,3 mg, tal como se especifica en las tablas correspondientes a cada uno de los ensayos (Capítulo 5).

Luego de la aplicación del compuesto radiactivo, las hojas se pulverizaron con una solución de aceite de silicona 10% en éter de petróleo, para favorecer la absorción del compuesto.

D. Aislamiento de los glicósidos cardenólidos

Las experiencias tuvieron una duración de 14 días, al cabo de los cuales se sacó la planta de tierra, se cortaron sus hojas y se lavaron sus raíces para eliminar restos de tierra. La superficie de las hojas se lavó con una mezcla de cloruro de metileno:etanol (70:30). Esta solución se llevó a volumen y se tomó una alícuota para determinar la radiactividad que había quedado sin absorber, al mismo tiempo que se la analizó por CCD (sistema 5) contra un testigo del compuesto inoculado. En todos los ensayos se comprobó que la radiactividad no absorbida correspondía al compuesto administrado y que no se trataba de algún metabolito del mismo, producido por la planta.

Los glicósidos cardenólidos fueron aislados moliendo las hojas y las raíces de la planta en un mortero, con ayuda de arena lavada y extrayendo el material vegetal con etanol 70% a reflujo. Los extractos etanólico-acuosos se concentraron y luego de evaporar el etanol, la fase acuosa remanente se extrajo 5 veces con cloruro de metileno.

E. Purificación del extracto de glicósidos cardenólidos

Luego de medir la radiactividad del extracto de cloruro de metileno, se agregaron 2 mg de cada uno de los glicósidos auténticos para facilitar su detección al purificar el extracto por CCD preparativa. El solvente utilizado para este propósito fue una mezcla de cloruro de metileno:metanol:agua (90:10:0,25) (sistema 4), realizándose 2 desarrollos con el referido solvente. A un costado de la placa preparativa se sembró una mezcla de los patrones correspondientes a los tres glicósidos.

Luego de desarrollar la placa, se tapó la zona correspondiente al extracto vegetal, con papel de aluminio y se reveló con ácido sulfúrico 50%, únicamente la mezcla de los tres patrones. Por elución con cloruro de metileno:etanol (70:30), se aislaron los productos de las distintas zonas de la placa correspondientes a cada uno de los glicósidos cardenólidos y a pigmentos de la planta. Estos últimos, al igual que los cardenólidos, presentaban actividad, pero no fueron analizados.

A la fracción correspondiente a cada glicósido se le agregaron 10 a 15 mg del respectivo compuesto puro, para su posterior recristalización hasta actividad específica constante.

F. Degradación de digitoxina- ^{14}C

Se degradó la digitoxina radiactiva ($2\text{-}^{14}\text{C}$) proveniente del ensayo de administración del ácido $3\beta,20(\text{R},\text{S})$ -dihidroxi- $23\text{-nor-}5\beta\text{-colánico-}24\text{-}^{14}\text{C}$ ($19\text{-}^{14}\text{C}$) a una planta Digitalis purpurea, siguiendo el procedimiento descrito en la página 102.

a) Hidrólisis de digitoxina (2) a digitoxigenina (1)

Se disolvió digitoxina ($2\text{-}^{14}\text{C}$) (7,9 mg; 0,01 mmoles) (act. específica: $1,49 \times 10^6$ dpm/mmol) en metanol (0,5 ml), se agregó ácido sulfúrico 0,1N (0,5 ml) y se calentó a reflujo durante 40 minutos. Se evaporó el metanol y la solución acuosa se extrajo con cloruro de metileno (3 x 2 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1 x 2 ml), con solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 2 ml) y con agua (1 x 2 ml), se secó y se evaporó el solvente. Se aislaron 5,4 mg de digitoxigenina, homogénea por CCD (sistema 5). Se midieron las radiactividades de la digitoxigenina y de la fase acuosa, la que contenía la digitoxosa. Esta última presentaba una radiactividad despreciable, mientras que la digitoxigenina presentaba la misma actividad específica que la digitoxina, es decir, $1,50 \times 10^6$ dpm/mmol.

b) Acetilación de digitoxigenina

La digitoxigenina (1) (5,4 mg) se trató con piridina (0,1 ml) y anhídrido acético (0,05 ml) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se volcó sobre una mezcla de ácido clorhídrico 2N y hielo y se extrajo con cloruro de metileno (4 x 2 ml), obteniéndose 3,5 mg de 3β -acetil-digitoxigenina de actividad específica: $1,52 \times 10^6$ dpm/mmol.

c) Ozonólisis de 3β -acetil-digitoxigenina

Se disolvió la 3β -acetil-digitoxigenina (3,5 mg; 0,008 mmoles) en cloruro de metileno (2 ml). El sistema se enfrió a -60°C y se pasó corriente de ozono. A los 20 minutos de reacción se comprobó por CCD (sistema 5) la desaparición del producto de partida. Luego de que el sistema alcanzara la temperatura ambiente, se agregó zinc (13 mg) y ácido acético (0,01 ml) y se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Se filtró el zinc y se separó la fase orgánica, que se lavó con agua (1 x 0,5 ml), solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 0,5 ml) y agua (1 x 0,5 ml). Se evaporó el solvente y el residuo (5,9 mg) se disolvió en metanol (0,2 ml) y se le agregó una solución acuosa de bicarbonato de potasio 10% (0,08 ml). Se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se agregó agua (3 ml) y se evaporó el metanol. Se extrajo con cloruro de metileno (4 x 1 ml).

La fase orgánica se lavó con agua (2 x 1 ml), se secó y se evaporó el solvente, aislándose 2,6 mg de 3β -acetoxi- 14β , 21β -dihidroxi- 5β -pregnan-20-ona (42).

Se midieron las radiactividades del compuesto 42 y de la fase acuosa (la que contiene el ácido glicólico (49)).

La radiactividad del producto 42 resultó despreciable, encontrándose la totalidad de la misma en la fase acuosa, la cual presentó una actividad específica de $1,50 \times 10^6$ dpm/mmol.



Resumen

La digitoxina es el principal glicósido cardenólido en plantas del género Digitalis, encontrándose en menor proporción los glicósidos gitoxina y digoxina.

El presente trabajo tuvo por objeto el estudio de los últimos pasos de la biosíntesis de estos glicósidos en la planta Digitalis purpurea, en particular la formación y cierre del anillo lactónico que poseen.

En el mismo se describen los siguientes temas:

1. Los antecedentes que dieron origen a este trabajo de investigación; entre ellos los glicósidos cardenólidos presentes en la planta Digitalis purpurea, su concentración, su acción farmacológica y los estudios sobre su biosíntesis.
2. Las síntesis de los distintos precursores, radiactivos o no, empleados en el estudio de los últimos pasos del camino biosintético, es decir:
 - a) la serie de compuestos con cadena lateral tipo β -hidroxi-ácido: ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos-24- ^{14}C .
 - b) la serie de compuestos con cadena lateral de ácido α,β no saturado: ácidos 23-norcol-20(22)(E)-énicos-24- ^{14}C .
3. La búsqueda de un buen método de inoculación de los compuestos radiactivos sintetizados, así como, las mejores condiciones.

para el aislamiento de los glicósidos cardenólidos y su posterior purificación.

4. Los estudios realizados por espectroscopía de RMN- ^{13}C de los efectos derivados por la quiralidad de C-20 en los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos y en sus ésteres etílicos. Para poder efectuar una correlación efectiva con compuestos análogos a los mismos, se sintetizaron como compuestos modelos 3 β ,20-hidroxi-20-metil-pregn-5-eno y su 3 β -acetoxi derivado, los cuales fueron analizados por espectroscopía de RMN- ^{13}C .
5. Las inoculaciones de los ácidos 20(R,S)-hidroxi-23-norcolanoicos-24- ^{14}C y 23-norcol-20(22)(E)-énicos-24- ^{14}C , en plantas enteras de Digitalis purpurea, del mismo grado de desarrollo y en condiciones controladas y reproducibles y el análisis de las incorporaciones absolutas logradas.
6. La degradación de la digitoxina radiactiva proveniente de uno de los ensayos de inoculación de un precursor radiactivo, con el objeto de comprobar que la radiactividad se hallaba localizada en el anillo lactónico de los glicósidos cardenólidos.

Con los resultados de las distintas experiencias se propuso y discutió la existencia de una ruta alternativa para la formación del anillo butenólido en la biosíntesis de los cardenólidos.





Bibliografía

1. F.J. Evans y P.S. Cowley - Phytochemistry 11, 2729 (1972).
2. F.J. Evans y P.S. Cowley - Phytochemistry 11, 2971 (1972).
3. E.R. Movitt - Digitalis and other cardiotonic drugs - Oxford University Press, New York (1949).
4. G.S. Fraenkel - Science 129, 1466 (1959).
5. T. Reichstein - Naturwiss. Rundsch. 20, 499 (1967).
6. S. Smith - J. Chem. Soc. 508, 2478 (1930).
7. A. Stoll - J. Am. Pharm. A. 27, 761 (1938).
8. L.M. Fieser y M. Fieser - Steroids, Cap. 20 - Reinhold Pub. Co., New York (1959).
9. T. Reichstein - Naturwiss. 54, 53 (1967).
10. K. Meyer y H. Lindl - Collection of Toad Venoms and Chemistry of one Toad Venom Steroids, en Venomous Animals and their Venoms, Vol. 2, 521 - Academic Press, New York (1971).
11. R. Tschesche - Planta Med., Supl. 4, 34 (1971).
12. R. Tschesche - Proc. Roy. Soc. London B180, 187 (1972).
13. R. Tschesche - Fortsch. Chem. org. Naturstoff. 12, 131 (1955).
14. H. Gregory y E. Leete - Chem. and Ind., 1242 (1960).
15. E. Leete, H. Gregory y E. Gros - J. Am. Chem. Soc. 87, 3475 (1965).
16. J. von Euw y T. Reichstein - Helv. Chim. Acta 47, 711 (1964).
17. R. Tschesche y G. Lilienweiss - Z. Naturforschg. 19b, 266 (1964).

18. R. Tschesche y B. Brassat - Z. Naturforschg. 21b, 894 (1966).
19. J.A.F. Wickramasinghe, E.P. Burrows, R.K. Sharma, J.B. Greig y E. Caspi - Phytochemistry 8, 1433 (1969).
20. E. Caspi y D.O. Lewis - Science 156, 519 (1967).
21. R. Bennett, H. Sauer y E. Heftmann - Phytochemistry 7, 41 (1968).
22. R. Tschesche, R. Hombach, H. Scholten y M. Peters - Phytochemistry 9, 1505 (1970).
23. E. Caspi y D.O. Lewis - Phytochemistry 7, 683 (1968).
24. R. Tschesche, H. Hulpke y H. Scholten - Z. Naturforschg. 22b, 677 (1968).
25. L. Canónica, F. Ronchetti y G. Russo - J. Chem. Soc. D, 1675 (1970).
26. D. Aberhart y E. Caspi - J. Chem. Soc. C, 2069 (1971).
27. R. Tschesche, R. Becker y R. Hombach - Z. Naturforschg. 23b, 1615 (1968).
28. R. Tschesche y R. Becker - Z. Naturforschg. 25b, 107 (1970).
29. E. Caspi, J.A.F. Wickramasinghe y D.O. Lewis - Biochem. J. 108, 499 (1968).
30. A.O. Colonna y E. Gros - J. Steroid Biochem. 4, 171 (1973).
31. T.A. Narwid, K.E. Cooney y M. Uskoković - Helv. Chim. Acta 57, 771 (1974).
32. A. Mijares, D.I. Cargill, J.A. Glasel y S. Lieberman - J. Org. Chem. 32, 810 (1967).
33. Y. Sheink y C. Djerassi - J. Org. Chem. 38, 3545 (1973).
34. W.R. Nes y T.E. Varkey - J. Org. Chem. 41, 3429 (1976).
35. L.M. Jackman y R.H. Wiley - J. Chem. Soc., 2881, 2886 (1960).

36. C. Djerassi, R. Engle y A. Bowers - J. Org. Chem. 21, 1547 (1956).
37. J.C. Collins, W.W. Hess y F.J. Frank - Tetrah. Letters, 3363 (1968).
38. A. Bowers, L.C. Ibáñez y H.J. Ringold - Tetrahedron 7, 138 (1959).
39. F. Sonderheimer, M. Velasco y G. Rosenkranz - J. Am. Chem. Soc. 77, 192 (1955).
40. P. De Ruggieri y C. Ferrari - J. Am. Chem. Soc. 81, 5725 (1959).
41. Y. Kamano, G. Pettit, M. Tozawa y S. Yoshida - J. Org. Chem. 42, 906 (1977).
42. E. Yoshii, T. Koizumi, S. Mizuno y E. Kitatsuji - Chem. Pharm. Bull. 24, 3216 (1976).
43. K. Meyer y T. Reichstein - Helv. Chim. Acta 30, 1508 (1947).
44. N. Danieli, Y. Mazur y F. Sondheimer - J. Am. Chem. Soc. 84, 875 (1962).
45. F.L. Greenwood - J. Org. Chem. 10, 414 (1945).
46. S. Rakhit y M. Gut - J. Org. Chem. 33, 1196 (1968).
47. L.H. Sarett (to Merck B.Co., Inc) (patente), U.S. 2,912,446 (1959); Chem. Abstr. 54, 3527 a (1960).
48. Boots Pure Drug Co. Ltd. (patente), Fr. 1,513,708 (Cl.Co7c, A 61k); Chem. Abstr. 71, 13284 m (1969).
49. E. Ramstad y J.L. Beal - Chem. and Ind., 177 (1960).
50. R.E. Marker, H.M. Crooks, Jr., E.M. Jones y A.C. Shalica - J. Am. Chem. Soc. 64, 1276 (1942).
51. R. Ikan, A. Markus y E. Bergmann - J. Org. Chem. 36, 3944 (1971).
52. O. Gisvold - J. Pharm. Sci. 52, 83 (1963).

53. E. Wegner - Pharmazie 7, 373 (1952).
54. M. Wichtl, M. Mangkudidjojo y W. Wichtl-Bleier - J. Chromatog. 234, 503 (1982).
55. G. Tittel, H. Habermeier y H. Wagner - Planta Med. 45, 207 (1982).
56. M.L. Boisio - J. Chromatog. 73, 279 (1972).
57. R.D. Bennett y E. Heftmann - Phytochemistry 4, 475 (1965).
58. P.R. White - The cultivation of animal and plant cells, 2a. edición - Ronald Press (1963).
59. H. Beierbeck, J.K. Saunders y J.W. ApSimon - Can. J. Chem. 55, 2813 (1977).
60. J.W. Blunt y J.B. Stothers - Org. Magn. Reson. 9, 439 (1977).
61. C. Le Cocq y J. Lallemand - J. Chem. Soc. - Chem. Comm. 4, 150 (1981).
62. H. Lee, N.S. Bhacca y M.E. Wolff - J. Org. Chem. 31, 2692 (1966).
63. H. Lee y M.E. Wolff - J. Org. Chem. 32, 192 (1967).
64. C. Altona y H. Hirschmann - Tetrahedron 26, 2173 (1970).
65. H. Hirschmann y F.B. Hirschmann - J. Biol. Chem. 184, 259 (1950).
66. R.A.W. Johnstone y C.C. Howard - J. Chem. Soc. - Perkin II, 1583 (1974).
67. G. Cooley, D.N. Kirk, R.E. Morgan y M.L. Sá e Melo - J. Chem. Soc. - Perkin I, 1390 (1977).
68. H.M. Garraffo - Síntesis de derivados esteroidales marcados isotópicamente y su ensayo como precursores biosintéticos de bufadienólidos de sapo - Tesis Doctoral, Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA (1985).
69. J.W. Frankenfeld y J.J. Werner - J. Org. Chem. 34, 3689 (1969).

70. L. Ruzicka, P.A. Plattner y J. Pataki - Helv. Chim. Acta
25, 425 (1942).
71. M. Mousseron-Canet e I. Beziat - Bull. Soc. Chim. France
6, 2572 (1968).
72. F. Hunziker y T. Reichstein - Helv. Chim. Acta 28, 1472 (1945).